



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΑ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΚΑΙ
ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΤΗ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ
*Bactrocera oleae***

ΤΡΟΧΑΤΟΥ ΟΥΡΑΝΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2007



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 5897/1
Ημερ. Εισ.: 27-05-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΤΡΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087233

Πίστετε ή μη, ερεΰνα.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Αυγουστίνος Αντώνης

Διδάσκοντας ΠΔ 407/80 του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου καθηγητή Μοριακής Βιολογίας κ. Κωνσταντίνου Ματθιόπουλου.

Γι' αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω καταρχάς τον κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο, που με δέχτηκε στο εργαστήριο του και με εμπιστεύθηκε δίνοντας μου την δυνατότητα να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα. Οι συμβουλές, η καθοδήγηση και η βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης της πτυχιακής μου εργασίας υπήρξαν πολύτιμες.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Τσουμάνη Κωνσταντίνα, Υποψήφια Διδάκτορα, για την άψογη συνεργασία και ιδιαίτερα για την ηθική υποστήριξη σε στιγμές που ήταν απαραίτητη. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Κακάνη Ευδοξία, Υποψήφια Διδάκτορα για την εργαστηριακή βοήθεια που μου προσέφερε και τη φίλη και συμφοιτήτρια μου Τσιρκώνη Βασιλίκη που ήταν δίπλα μου τις στιγμές που την χρειάστηκα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1 Ο δάκος της ελιάς.....	6
1.1.1 Μορφολογία.....	6
1.1.2 Βιολογικός κύκλος του εντόμου.....	7
1.1.3 Προκαλούμενη ζημιά.....	9
1.1.4 Τρόποι Καταπολέμησης	10
1.1.5 Χημική καταπολέμηση.....	10
1.1.6 Βιολογική καταπολέμηση.....	11
1.2 Γενετική και κυτταρολογική ανάλυση.....	12
1.3 Μοριακή οργάνωση.....	14
1.4 Δορυφορικό DNA.....	16
1.5 Μεταθετά στοιχεία.....	18
1.6 Σκοπός εργασίας	22
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	23
2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	26
2.3 Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού.....	28
2.4 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης	29
2.5 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (Ligation).....	30
2.6 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια (transformation).....	31
2.7 Υγρές Καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων.....	34
2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	35
2.9 Υβριδοποίηση κατά Southern.....	37
2.10 Σήμανση DNA για την δημιουργία ανιχνευτή (probe).....	40
2.11 Πρωτόκολλο μερικής πέψης ενζύμων περιορισμού (partial digestion).....	41
2.12 Απαλοιφή DNA τμημάτων με χρήση Exonuclease III	44
2.13 Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης DNA και επεξεργασία αλληλουχίας με το πρόγραμμα Omiga.....	46

Αντιδραστήρια – Διαλύματα.....	46
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1 Χαρτογράφηση με ένζυμα περιορισμού του φάγου 276.....	51
3.2 Κλωνοποίηση 276/1 (8.0kb EcoRI).....	54
3.3 Υποκλωνοποίηση 276/1 (8.0kb EcoRI).....	54
3.4 Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης δειγμάτων 28, 34, 47 και επεξεργασία με Omiga	56
3.5 Κλωνοποίηση BoR300	57
3.6 Στοιχισή αλληλουχιών BoR300.....	58
3.7 Υβριδοποίηση κατά Southern γενωμικού DNA εντόμων με ανιχνευτή το BoR300	59
3.8 PCR με BoR300 primers.....	60
3.9 Υβριδοποίηση κατά Southern γενωμικού DNA ατόμων του γένους Bactrocera με ανιχνευτή το BoR300.....	61
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	62
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, είναι το πιο επιβλαβές έντομο των ελαιοκαλλιεργειών. Λόγω της εξαιρετικής οικονομικής σημασίας του πρέπει να αναπτυχθούν μέθοδοι δακοπροστασίας, αποτελεσματικές από αυτές που εφαρμόζονται στις μέχρι σήμερα. Η περιορισμένη γνώση της μοριακής οργάνωσης του εντόμου αποτελεί εμπόδιο για την εύρεση γενετικών μεθόδων διαχείρισης. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η συνεισφορά στην απόκτηση γνώσης της μοριακής οργάνωσης. Στα πλαίσια του στόχου αυτού επιτεύχθηκε η χαρτογράφηση και επεξεργασία του φάγου 276 που οδήγησε στην απομόνωση μιας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας 300bp, που ονομάστηκε BoR300. Το BoR 300 απουσιάζει από γνωστά έντομα της τάξης των διπτέρων όπως το *Ceratitis Capitata*, η *Drosophila melanogaster* και το *Anopheles gambiae* αλλά και από είδη του γένους *Bactrocera* όπως το *B. correcta*, το *B. currenbitae* και το *B. Dorsalis*. Το BoR300 είναι ένα επαναλαμβανόμενο στοιχείο που εντοπίζεται ειδικά στο *Bactrocera oleae*.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ελιά είναι ένα αειθαλές δέντρο, πολύτιμο για τον καρπό του, που αποτελεί βασικό μέσο διατροφής. Κατάγεται από την Μ. Ασία και την Ελλάδα και καλλιεργείται από τα αρχαιότατα χρόνια. Σήμερα σε όλη την υδρόγειο υπάρχουν περίπου 800 εκατομμύρια ελαιόδεντρα από τα οποία το 95% περίπου φύονται στην λεκάνη της Μεσογείου, που διαθέτει άριστες εδαφοκλιματικές συνθήκες για ανάπτυξη της ελιάς. Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις Διεθνούς Συμβουλίου του Ελαιολάδου (ΙΟΟC), η συνολική αξία των ελαιοκομικών προϊόντων ανέρχεται σε 2,8 τρισεκατομμύρια δολάρια από τα οποία 300 εκατομμύρια αντιστοιχούν στο εισόδημα της βρώσιμης ελιάς (www.internationaloliveoil.org).



Στην Ελλάδα, η ελιά είναι καλλιέργεια με πολύ μεγάλη διάδοση. Έχει αναπτυχθεί στις παραθαλάσσιες περιοχές της Ηπειρωτικής Ελλάδας και στα νησιά. Η εξάπλωση της ελαιοκαλλιέργειας είναι μεγαλύτερη από κάθε άλλο είδος καρποφόρου δέντρου και καταλαμβάνει πάνω από 6,5 εκατομμύρια στρέμματα, έκταση που αναλογεί στο 15% περίπου της καλλιεργούμενης γεωργικής γης και στο 75% των εκτάσεων των δενδρωδών καλλιεργειών (www.elialadi.gr). Η χώρα μας παράγει ετησίως περίπου 70 χιλιάδες τόνους βρώσιμης ελιάς και θεωρείται μετά την Ισπανία δεύτερη στις εξαγωγές βρώσιμης ελιάς (www.elialadi.gr).

Πέρα από την οικονομική της σημασία η ελιά συμβάλλει σημαντικά στην διατήρηση του περιβάλλοντος γιατί προσφέρεται καλύτερα για αξιοποίηση των εδαφών που εξαρτώνται μόνο από βροχοπτώσεις. Σε τέτοιες ευαίσθητες περιοχές η εγκατάσταση άλλων καλλιεργειών εκτός της ελιάς εκθέτει τα εδάφη στον κίνδυνο των διαβρώσεων, ενώ η ελαιοκαλλιέργεια και συγκαλλιέργεια με χειμερινά σιτηρά ή ψυχανθή προσφέρεται για την συντήρηση των προβληματικών αυτών εδαφών.

Ως προς τον κοινωνικό της ρόλο, η ελαιοκομία έχει αναπτυχθεί σε λιγότερο ευνοημένες ορεινές και ημιορεινές περιοχές, με το χαμηλότερο γεωργικό εισόδημα, και δύσκολα η ελιά μπορεί να αντικατασταθεί με άλλες καλλιέργειες λόγω τόσο των δυσμενών εδαφοκλιματικών συνθηκών όσο και της φύσης της (πολυετής καλλιέργεια). Η ελαιοκαλλιέργεια επομένως θεωρείται ως λύση για διατήρηση των γεωργικών πληθυσμών στις περιοχές αυτές και προσφέρει απασχόληση σε ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού των ελαιοπαραγωγικών χωρών.

Η οικονομική, περιβαλλοντική και διατροφική αξία της ελιάς είναι ιδιαίτερα σημαντική γι' αυτό και κάθε 'εχθρός' θα πρέπει να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά. Ο δάκος θεωρείται ο σοβαρότερος εχθρός για την ελληνική και την παγκόσμια ελαιοκομία. Η κύρια αιτία εστιάζεται στο γεγονός ότι ο δάκος διατηρεί το χαρακτηριστικό της προσβολής καθ'όλο το έτος, σε σχέση με άλλους εχθρούς του ελαιοδένδρου που παρουσιάζουν τοπικό χαρακτήρα και συχνά χρονικό περιορισμό στην περίοδο εμφάνισής τους. Οι ζημιές που ο δάκος προκαλεί στον ελαιοκαρπο δεν είναι μόνο ποσοτικές αλλά και ποιοτικές. Επιφέρει σημαντική μείωση στην ετήσια ελαιοπαραγωγή και υποβαθμίζει ποιοτικά τη βρώσιμη ελιά και το παραγόμενο ελαιόλαδο. Η καταπολέμηση του δάκου είναι αναγκαία και μια συνεχώς εξελισσόμενη διαδικασία που βασίζεται σε έρευνα της συμπεριφοράς και γενετικής του εντόμου.

1.1 Ο δάκος της ελιάς

1.1.1 Μορφολογία

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, ανήκει στην κλάση Entoma, τάξη Diptera, οικογένεια Tephritidae, γένος *Bactrocera* και είδος *oleae*. Είναι είδος μονοφάγο. Στη φύση, η ωοτοκία του θηλυκού ακμαίου και η διατροφή και ανάπτυξη της προνύμφης περιορίζεται μόνο στους καρπούς του γένους *Olea* (Γαμβριάς Χ., 1994).

Η εξέλιξη του εντόμου χαρακτηρίζεται από τέσσερα στάδια, το αυγό, την προνύμφη η οποία διακρίνεται σε τρία στάδια (L1, L2, και L3), τη νύμφη και το τέλειο έντομο (Εικ.1). Το αυγό είναι λευκό, στενόμακρο και κάπως οξύ στον ένα πόλο. Η προνύμφη (larva) είναι και αυτή στενόμακρη και έχει μήκος προς το τέλος της ανάπτυξης της (στάδιο L3) μήκος 7mm περίπου. Η νύμφη (pupa) έχει σχήμα ελλειψοειδές και διαθέτει ως περίβλημα το σκληρυμένο δερμάτιο της αναπτυγμένης προνύμφης. Έχει μήκος 4-4,5mm και ο χρωματισμός της ποικίλει από ωχροκίτρινος μέχρι καστανός. Το τέλειο έντομο μοιάζει με την κοινή μύγα. Έχει μήκος 4-5mm και άνοιγμα φτερών 12mm.



Εικόνα 1. Δάκος, το τέλειο έντομο.



Εικόνα 2. Το θηλυκό έντομο.

Χαρακτηριστικό του εντόμου αποτελεί η καστανή κηλίδα στην κορυφή των διαφανή φτερών του και οι μεγάλοι σύνθετοι κοκκινωποί οφθαλμοί. Στο θηλυκό άτομο είναι ευδιάκριτος με γυμνό μάτι ο ωοθέτης (Εικ.2).

1.1.2 Βιολογικός κύκλος του εντόμου

Διαχείμαση : Ο δάκος διαχειμάζει κυρίως ως νύμφη στο έδαφος (Εικ.3) αλλά και ως ενήλικο σε προφυλαγμένες θέσεις. Σε χρονιές και σε περιοχές με ήπιες καιρικές συνθήκες κατά τη διάρκεια του χειμώνα και εφόσον υπάρχει στα δέντρα κατάλληλος ηρτημένος ελαιόκαρπος, είναι δυνατόν να συνυπάρχουν στον ελαιώνα όλα τα στάδια



Εικόνα 3. Νύμφες που διαχειμάζουν το έδαφος.

του δάκου αφού το έντομο εξελίσσεται και αναπτύσσεται με βραδύ μεν ρυθμό αλλά κανονικά. Η έξοδος των ακμαίων από το έδαφος λαμβάνει χώρα κυρίως κατά την περίοδο, αργά την άνοιξη μέχρι τις αρχές του καλοκαιριού. Ο χρόνος της εξόδου των ακμαίων από το έδαφος εξαρτάται κυρίως από τις συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και τη σύσταση του εδάφους. Στις περιοχές ή τις χρονιές με βαρύ χειμώνα και επικράτηση παρατεταμένων χαμηλών θερμοκρασιών κατά τη διάρκεια της άνοιξης σημειώνονται καθυστερημένες εξοδοί από το έδαφος μέχρι τα μέσα του καλοκαιριού, ενώ σ' εκείνες με ήπιο χειμώνα παρατηρούνται εξοδοί από το έδαφος από νωρίς την άνοιξη.

Αναπαραγωγή : Κατά μέσο όρο η διαδικασία της σύζευξης των τέλειων εντόμων, διαρκεί περίπου 2,5 ώρες και λαμβάνει χώρα προς το τέλος της ημέρας. Τα αρσενικά είναι πολύγαμα και συζεύγνυνται περίπου μια φορά την ημέρα, ενώ τα θηλυκά είναι ολίγαμα και σπάνια συζεύγνυνται περισσότερο από μια ή δύο φορές στη διάρκεια της ζωής τους. Ο συνηθέστερος αριθμός αυγών που παράγει και εναποθέτει ένα θηλυκό είναι από 200 έως 500 αυγά (Economopoulos et al., 1971).

Στη φύση η γονιμότητα του δάκου επηρεάζεται από τις καιρικές συνθήκες, τη διαθεσιμότητα του ελαιόκαρπου και την ικανότητα του θηλυκού που σχετίζεται με τη διατροφή του. Πειράματα έδειξαν ότι ο αριθμός των αυγών που εναποθέτονται στον ελαιόκαρπο καθορίζει ως ένα μεγάλο βαθμό και τον αριθμό των ενηλίκων που θα παραχθούν. Αυτό το γεγονός υποδεικνύει, ότι οι παράγοντες που επηρεάζουν τη γονιμότητά του (αναφέρονται παραπάνω), καθορίζουν σημαντικά και το μέγεθος του πληθυσμού του εντόμου (Fletcher BS. et al., 1978).

Εναπόθεση-Ωοτοκία: Το θηλυκό έλκεται από τον ξενιστή όταν ο ελαιόκαρπος είναι κατάλληλος για εναπόθεση. Ελκυστικές, διεγερτικές της εναπόθεσης και αποτρεπτικές πτητικές ουσίες, οι οποίες ελευθερώνονται από τους καρπούς κατά τη διάρκεια ορισμένων σταδίων ανάπτυξης τους, φαίνεται ότι επηρεάζουν την εναπόθεση. Οι άριστες θερμοκρασίες για την εναπόθεση αυγών είναι μεταξύ 20°C και 30°C, ενώ η εναπόθεση σταματάει σε θερμοκρασίες κάτω από 15°C και πάνω από 33°C. Κατά κανόνα το θηλυκό εναποθέτει ένα αυγό ανά καρπό. Η οπή ωοτοκίας του δάκου, το κοινώς αποκαλούμενο «νύγμα», βοηθάει στην εγκατάσταση στον ελαιόκαρπο του μύκητα *Sphaeropsis (Macrophoma) dalmatica*, ο οποίος προκαλεί την «ξεροβούλα» στις πράσινες και τη «σαποβούλα» στις μαύρες ελιές.

Στάδια εξέλιξης του εντόμου: Μετά την εναπόθεση του αυγού από το θηλυκό στον ελαιόκαρπο ακολουθεί η επώαση του αυγού, η διάρκεια της οποίας εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Στη φύση, κυμαίνεται από 2-4 ημέρες το καλοκαίρι, μέχρι 4-10 ημέρες το φθινόπωρο και 12-19 ημέρες το χειμώνα. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης του αυγού εκκολάπτεται η προνύμφη, η οποία προβαίνει στη διάνοιξη ακανόνιστων στοών



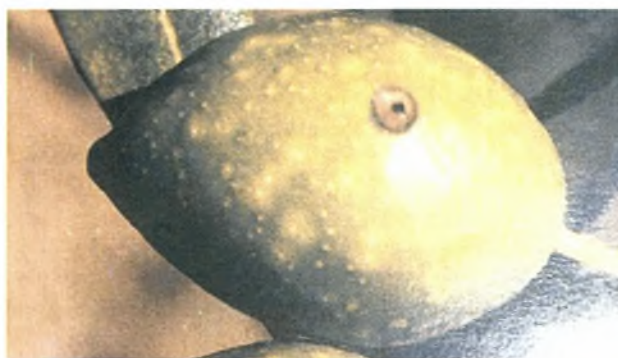
Εικόνα 4. Στοά από προνύμφη δάκου μέσα σε ελαιόκαρπο.

στον ελαιόκαρπο (Εικ.4). Στον αγρό η ανάπτυξη των νυμφών ολοκληρώνεται σε 16 ημέρες το καλοκαίρι, 12-88 ημέρες το φθινόπωρο, 41-92 ημέρες το χειμώνα και 17-21 ημέρες την άνοιξη. Με την ολοκλήρωση της ανάπτυξής της η νύμφη μεταμορφώνεται σε τέλειο έντομο, το οποίο εξέρχεται από τον ελαιόκαρπο σχίζοντας τη ρυτιδωμένη επιδερμίδα πάνω από το θάλαμο νύμφωσης .

Συνεπώς, μπορεί εύκολα κανείς να διαπιστώσει ότι ο βιολογικός κύκλος του δάκου της ελιάς επηρεάζεται άμεσα από περιβαλλοντικούς παράγοντες, με πιο αντιπροσωπευτικούς τη θερμοκρασία και τη σχετική υγρασία. Παρ' όλο που ακολουθεί συγκεκριμένα στάδια, η διάρκεια τους αλλά και ο αριθμός των γενεών διαφέρει μεταξύ διαφόρων περιοχών.

1.1.3 Προκαλούμενη ζημιά

Ο δάκος προξενεί σημαντικές οικονομικές ζημιές στην ελαιοπαραγωγή, τόσο ποσοτικές όσο και ποιοτικές (Vossen et al., 2005). Η ποσοτική ζημιά συνίσταται τόσο στην πρόωρη πτώση του προσβεβλημένου ελαιοκάρπου, πριν δηλαδή να



Εικόνα 5. Πληγή επικάρπιου ως ένδειξη προσβολής από το δάκο.

φθάσει η περίοδος της συλλογής, όσο και στην μείωση της σάρκας του ελαιοκάρπου (μείωση του βάρους), η οποία κατατρώγεται από την προνύμφη του δάκου (Εικ.5). Η ποιοτική ζημιά αναφέρεται στην ποιοτική υποβάθμιση τόσο του ελαιόλαδου, η οποία οφείλεται στην αύξηση της οξύτητας και στην αλλοίωση των οργανοληπτικών του ιδιοτήτων, όσο και των βρώσιμων ελιών, λόγω της μείωσης της εμπορικής αξίας τους μέχρι και της ακαταλληλότητάς τους για διάθεση στην αγορά. Είναι ευρέως γνωστό ότι οι προσβεβλημένες από τον δάκο ελιές παράγουν λάδι αυξημένης οξύτητας και ότι όσο το ποσοστό της δακοπροσβολής αυξάνει τόσο αυξάνει και η οξύτητα του παραγόμενου ελαιόλαδου. Επίσης οι οπές εξόδου του δάκου στον ελαιόκαρπο ευνοούν και την οξείδωση (τάγγισμα) του ελαιόλαδου λόγω της έκθεσής του στον ατμοσφαιρικό αέρα. Ακόμη η έντονη δακοπροσβολή προκαλεί και υποβάθμιση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαιόλαδου, εξαιτίας των προνυμφών του εντόμου που υπάρχουν μέσα στον ελαιόκαρπο και οι οποίες αλέθονται μαζί του στο ελαιοτριβείο, προκαλώντας το αποκαλούμενο «wormy smell».

1.1.4 Τρόποι Καταπολέμησης

Η καταπολέμηση του δάκου της ελιάς αντιμετωπίζεται με χημικές και βιολογικές μεθόδους. Η χημική καταπολέμηση παραμένει ακόμα και σήμερα η βασική και πιο αποτελεσματική μέθοδος καταπολέμησης του δάκου. παρά την εκτεταμένη έρευνα που έλαβε χώρα κατά την διάρκεια της πολύχρονης εφαρμογή της σε πολλές χώρες και περισσότερο στην χώρα μας για την αντικατάστασή της με άλλη μέθοδο που να είναι πιο φιλική προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο.

1.1.5 Χημική καταπολέμηση

Η χημική καταπολέμηση του δάκου εφαρμόζεται με δυο μεθόδους, την θεραπευτική και την προληπτική ή δολωματική μέθοδο. Η θεραπευτική μέθοδος συνίσταται στην εφαρμογή ψεκασμών πλήρους κάλυψης των ελαιοδέντρων με ένα κατάλληλο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο. Σκοπός της θεραπευτικής μεθόδου είναι η θανάτωση τόσο των ακμαίων εντόμων που κυκλοφορούν στον ελαιώνα , όσο και των διαφόρων σταδίων της προνύμφης που βρίσκονται μέσα στον ελαιόκαρπο. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η θεραπεία τόσο της γόνιμης δακοπροσβολής που έχει εκδηλωθεί όσο και εκείνης που θα εκδηλωνόταν μέσα σε ορισμένο χρονικό διάστημα. Τα πιο συνηθισμένα εντομοκτόνα είναι τα οργανοφωσφορικά, όπως το Fenthion και το Dimethoate. Εκτός από αυτά, υπάρχουν διαθέσιμα και τα καρβαμυδικά, τα κυκλοδιένεια, οι αλκυλαμίδες και τα πυρεθρουνοειδή. Όλα τα παραπάνω δρουν στις νευρομυϊκές συνάψεις παρακωλύοντας τη νευρομυϊκή διαβίβαση και προκαλώντας τελικά το θάνατο του εντόμου.

Η προληπτική μέθοδος συνίσταται στην εφαρμογή, από το έδαφος ή τον αέρα, ψεκασμών με δηλητηριώδη δολώματα που περιέχουν μια ελκυστική ουσία δάκου και ένα εντομοκτόνο. Σκοπός των δολωματικών ψεκασμών είναι η προσέλκυση και θανάτωση των ακμαίων ατόμων του δάκου πριν αρχίσει η εναπόθεση των αυγών στον ελαιόκαρπο. Με τον τρόπο αυτό ανακόπτεται η αναπαραγωγική εξέλιξη του εντόμου και κατά συνέπεια αποφεύγεται η προσβολή του ελαιοκάρπου.

Τα κυριότερα δολώματα ή δακοπαγίδες που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι οι κίτρινες κολλώδης παγίδες, η παγίδα McPhail και οι παγίδες έλξης και θανάτου (Economidou AP., 1979). Συγκεκριμένα, οι κίτρινες κολλώδης παγίδες διαθέτουν μία κάψουλα φερομόνης (spiroketal) που προσελκύουν τα αρσενικά άτομα και μία

κάψουλα που αποτελεί τροφή (διττανθρακικό αμμώνιο) για να προσελκύσουν και τους αρσενικούς και τους θηλυκούς ενήλικους δάκους.

Η παγίδα McPhail (Εικ.6) χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στην Ευρώπη, κυρίως για έλεγχο, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις και για μαζική παγίδευση. Είναι φτιαγμένη είτε από γυαλί είτε από πλαστικό με μία μικρή δεξαμενή για υγρό δόλωμα που περιέχει 4% διάλυμα αμμωνιακών αλάτων (διττανθρακικό αμμώνιο ή φωσφορικό αμμώνιο) ως παγίδες έλξης. Οι μύγες μπαίνουν από κάτω και πνίγονται στο διάλυμα.



Εικόνα 6. Η παγίδα McPhail.



Εικόνα 7. Παγίδες έλξης και θανάτου.

Οι παγίδες έλξης και θανάτου (Εικ.7) του δάκου διαθέτουν ένα πλαίσιο από χαρτόνι εμποτισμένο με εντομοκτόνο με προσαρτημένη αμμωνία και φερομόνη που έλκουν το έντομο. Τα έντομα έρχονται σε επαφή με το εντομοκτόνο αλλά πηγαίνουν αλλού να πεθάνουν και έτσι η παγίδα δεν κορένεται.

1.1.6 Βιολογική καταπολέμηση

Η χημική καταπολέμηση που παρουσιάστηκε αμφισβητήθηκε έντονα τα τελευταία χρόνια. Η μαζική και εκτεταμένη χρήση των εντομοκτόνων οδήγησε στην εμφάνιση ατόμων ανθεκτικών στα εντομοκτόνα. Αυτό το γεγονός οφείλεται σε μεταλλάξεις στα γονίδια που αφορούν το νευρικό σύστημα, το οποίο είναι το κέντρο δράσης των εντομοκτόνων, που επιτρέπουν την επιβίωση στα άτομα που τις διαθέτουν (Vontas et al., 2002). Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι τα χημικά εντομοκτόνα δεν παρουσιάζουν εκλεκτικό τρόπο δράσης, τα καθιστά επικίνδυνα και για ωφέλιμα έντομα.

Η ανάγκη λοιπόν για την εξεύρεση ασφαλών μεθόδων καταπολέμησης του δάκου οδήγησε στην έρευνα για τον βιολογικό έλεγχο του παρασίτου. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν ιθαγενή παράσιτα του δάκου όπως η κηκιδόμυγα *Prolasioptera berlesiana*, η οποία είναι εκτοπαράσιτο των αυγών του δάκου καθώς επίσης και τα υμενόπτερα *Eupelmus urozonus*, *Pnigalio mediterraneus* και *Eupelmus martellii*, τα οποία είναι εκτοπαράσιτα των προνυμφών του δάκου (Arambourg.Y., 1966). Όμως, η σημασία αυτών των παρασίτων στην βιολογική καταπολέμηση του δάκου δεν είναι

μεγάλη, δεδομένου ότι η δράση τους περιορίζεται χρονικά στη διάρκεια του καλοκαιριού, ενώ κατά το φθινόπωρο που παρατηρείται αύξηση δακοπληθυσμού, μειώνεται σημαντικά ο πληθυσμός. Το ίδιο αποτέλεσμα είχαν και εξωτικοί φυσικοί πληθυσμοί που έγινε προσπάθεια εγκατάστασης τους όπως το ενδοπαράσιτο προνύμφης, *Opius concolor* (Karpatos ET et al., 1984). Μία ακόμα μέθοδος καταπολέμησης είναι η τεχνική στείρωσης των εντόμων (S.I.T, Sterile Insect Technique). Η μέθοδος αυτή συνίσταται στην εκτροφή και στείρωση αρσενικών ατόμων δάκου στο εργαστήριο με ακτινοβολίες και εξαπόλυσή τους στον ελαιώνα. Στηρίζεται στη βασική αρχή ότι η αναπαραγωγική επαφή στείρου αρσενικού, που ανταγωνίζεται αποτελεσματικά τα άγρια, με το ακμαίο φυσιολογικό θηλυκό οδηγεί σε στείρα ωοτοκία. Αυτό έχει ως συνέπεια την ελάττωση μέχρι και την τελεία εξαφάνιση του πληθυσμού κάτω από συνθήκες συνεχούς εξαπόλυσης στείρων αρσενικών (Economidou, 1972, 2002). Παρόλα αυτά και αυτή η τεχνική δεν είχε τα αναμενόμενα αποτελέσματα στην εφαρμογή της και δεν υπόσχεται ότι μπορεί να συμβάλει στην αντιμετώπιση του δάκου της ελιάς.

Παρατηρούμε ότι η χρήση μεμονωμένων μεθόδων καταπολέμησης δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί.. Οδηγούμαστε λοιπόν σε μια σύγχρονη ιδέα φυτοπροστασίας που αναφέρεται στο συνδυασμό όλων των παραγόντων και όλων των μεθόδων για διατήρηση των πληθυσμών των φυτοφάγων ειδών σε μια πυκνότητα κατώτερη από εκείνη που προκαλεί οικονομική ζημιά, στο πλαίσιο του σεβασμού των οικολογικών, τοξικολογικών και οικονομικών αρχών.

1.2 Γενετική και κυτταρολογική ανάλυση

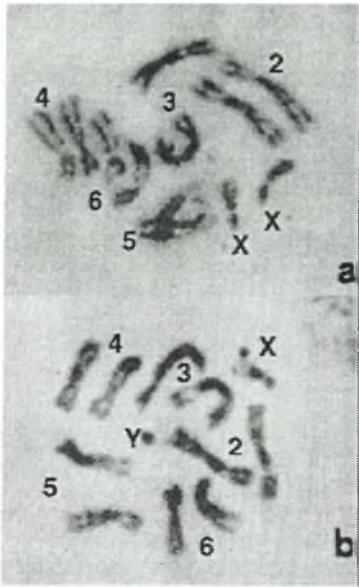
Όπως διαπιστώθηκε παραπάνω είναι αναγκαία η ανακάλυψη εναλλακτικών μεθόδων για τον έλεγχο των πληθυσμών του εντόμου που να είναι πιο επιλεκτικές και πιο φιλικές στο περιβάλλον. Ένας τρόπος ελέγχου είναι μέσω της γενετικής διαχείρισης του εντόμου με μεθόδους ανασυνδυασμένου DNA, όμως αυτό απαιτεί έναν άριστο χαρακτηρισμό του γονιδιώματος. Παρά το γεγονός ότι ο δάκος είναι ένα έντομο εξαιρετικής σημασίας, η ανάλυση του σε μοριακό, κυτταρολογικό και γενετικό επίπεδο υστερεί σε σχέση με τα άλλα είδη της οικογένειας Tephritidae.

Τα πρώτα κυτταρολογικά δεδομένα του μιτωτικού καρυότυπου του *Bactrocera olea*, παρουσιάστηκαν από τους Frizzi and Springetti (1953), οι οποίοι ανέφεραν την ύπαρξη πέντε τελομερικών και ενός ακροκεντρικού ζευγαριού χρωμοσωμάτων και

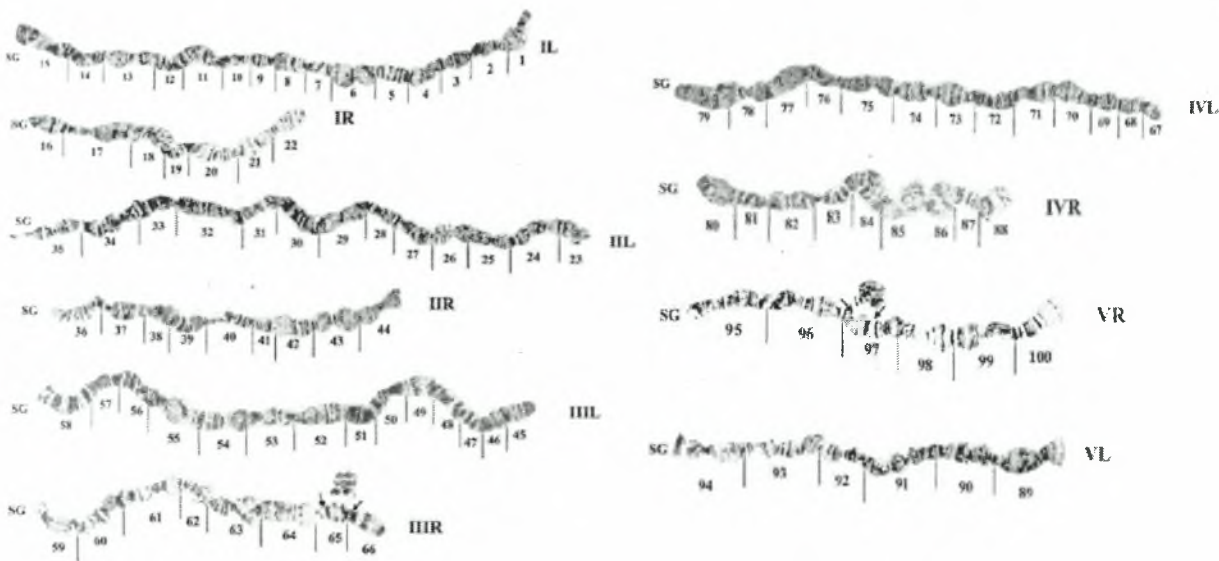
έπειτα παρουσιάστηκαν και άλλες ερευνές με περιγραφές των χρωμοσωμάτων (Krimbas, 1963. Mavragani-Tsipidou et al.,1992)

Όλες οι μελέτες αναφέρουν την ύπαρξη 6 ζευγών χρωμοσωμάτων συμπεριλαμβανόμενου ενός ζεύγους φυλετικών χρωμοσωμάτων. Τα φυλετικά χρωμοσώματα είναι εύκολα αναγνωρίσιμα λόγω του μικρού τους μεγέθους (Εικ.8). Συγκεκριμένα, το Y χρωμόσωμα είναι το μικρότερο απ’ όλα τα χρωμοσώματα ενώ το X απο τα αυτοσωμικά (αναλογία μήκους Y/X=0,20). Επιπρόσθετα, το αρσενικό έντομο είναι ετερογαμετικό-XY (Εικ.8).

Έπειτα, η ερέυνα συνεχίστηκε στα πολυταινικά χρωμοσώματα που προέρχονται από τρεις διαφορετικούς προνυμφικούς ιστούς, του λιπώδους ιστού (Mavragani-Tsipidou et al., 1992), των σιελογόνων αδένων (Krimbas, 1963) και των μαλπιγγειακών σωληναρίων (Zambetaki et al., 1995). Έτσι, δημιουργήθηκαν φωτογραφικοί χάρτες που αποτέλεσαν σημαντικά κυτταρογενετικά δεδομένα για την περαιτερω αξιοποίηση τους σε τεχνικές όπως η in situ υβριδοποίηση (Εικ.9).



Εικόνα 8. Μιτωτικά μεταφασικά χρωμοσώματα από γάγγλια του *B.oleae*. (α) Θηλυκή προνύμφη (β) Αρσενική προνύμφη.



Εικόνα 9. Φωτογραφικοί χάρτες των δεξιών (R) και αριστερών (L) βραχιόνων των πολυταινικών χρωμοσωμάτων (I-V) των σιελογόνων αδένων του *B. oleae*.

Μέσω αυτής της τεχνικής χαρτογραφήθηκαν 10 μοριακοι δείκτες για όλα τα

σωματικά χρωμοσώματα του εντόμου (Zambetaki et al., 1999) και με αυτό τον τρόπο έγινε εφικτός ο καθορισμός των φυλογενετικών σχέσεων του εντόμου με άλλα είδη της οικογένειάς του.

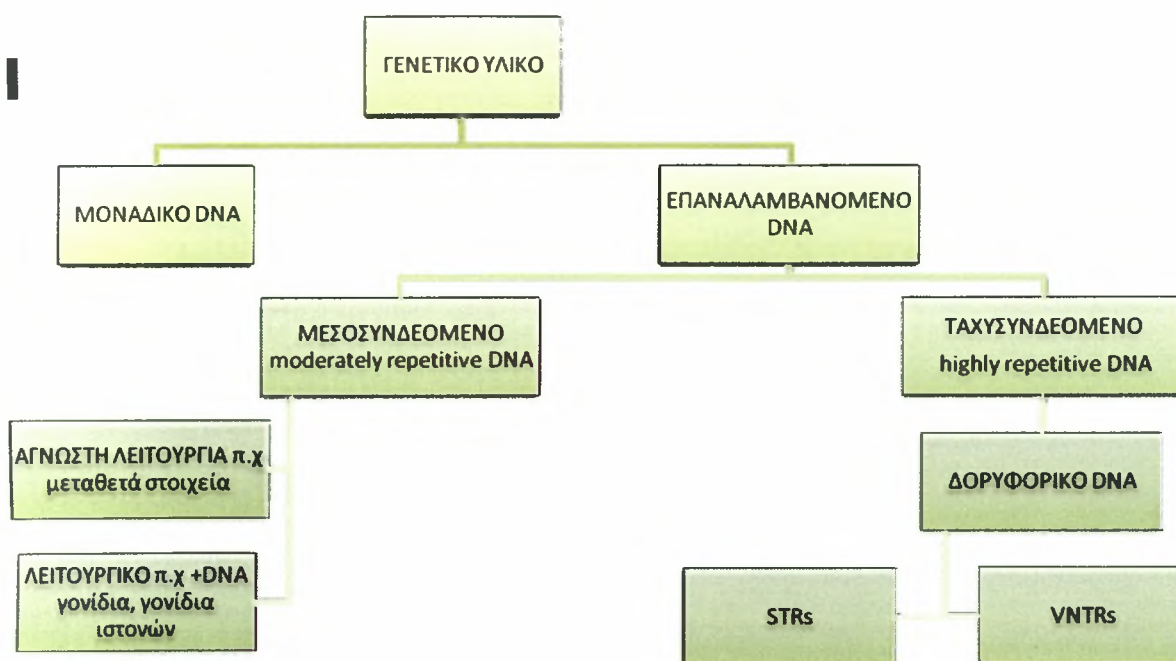
Γενικότερα, έχουν απομονωθεί ελάχιστα γονίδια από τον δάκο όπως αυτό της αλκοολικής δευδρογονάσης (Benos et al., 2000) και γονίδια φυλοκαθορισμού (Lagos et al., 2005). Πολλά στοιχεία του γονιδιώματος του δάκου παραμένουν αδιευκρίνιστα και έτσι δεν είναι ακόμα εφικτή η γενετική διαχείριση ελέγχου του εντόμου. Όμως, πολλές μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη και είναι θέμα χρόνου να αποκαλυφθούν τα στοιχεία που συνθέτουν τη βιολογία και τη γενετική του εντόμου.

1.3 Μοριακή οργάνωση

Ο χαρακτηρισμός των χρωμοσωμάτων του *Bactrocera olea* είναι βασική προϋπόθεση για την οποιαδήποτε προσπάθεια διερεύνησης της μοριακής οργάνωσης του γονιδιώματος του εντόμου. Αυτό, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, θα μπορούσε να οδηγήσει στον καθορισμό της πρωτοταγούς αλληλουχίας του DNA του εντόμου και να δώσει κατάλληλα εργαλεία για τη γενετική διαχείριση του εντόμου. Παράλληλα, όμως, ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του γονιδιώματός του θα μπορούσαν να διαλευκάνουν βιολογικούς μηχανισμούς που δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί σε παρεμφερή μοντέλα.

Μεχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί πλήρως τα γονιδιώματα εντόμων όπως *Anopheles gambiae* (mosquito), *Apis mellifera* (honey bee), *Drosophila melanogaster* (fruitfly), *Tribolium castaneum* (red flour beetle) και *Nasonia vitripennis* (jewel wasp) (Blast database). Το έντομο που απασχόλησε περισσότερο την επιστημονική κοινότητα είναι η *Drosophila melanogaster*, η οποία αποτελεί σήμερα γενετικό μοντέλο. Παρόλο που η οικονομική σημασία του εντόμου είναι δεν είναι ιδιαίτερη, ερευνήθηκε ως πρότυπο για την αποκάλυψη μηχανισμών του κυττάρου αλλά και για την αναγνώριση χαρακτηριστικών που αφορούν αποκλειστικά τα έντομα. Η *Drosophila melanogaster* επιλέχθηκε ως γενετικό μοντέλο λόγω του μικρού γονιδιώματος της και της εύκολης εκτροφής της.

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι για την μοριακή οργάνωση των γονιδιωμάτων. Ο απλούστερος κατηγοριοποιεί τμήματα DNA με βάση την επαναληψιμότητά τους στο σύνολο του γενετικού υλικού (Εικ.10).



Εικόνα 10. Μοριακή οργάνωση γονιδιωμάτων.

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το γενετικό υλικό χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, το μοναδικό DNA και το επαναλαμβανόμενο.

Το μοναδικό DNA (unique DNA) εκπροσωπεί μοναδικές αλληλουχίες που μεταφράζονται σε πρωτεΐνες και αποτελεί μικρό ποσοστό του συνολικού γονιδιώματος. Στη *Drosophila melanogaster* που έχει ολοκληρωθεί η μοριακή οργάνωση του γονιδιώματος, βρέθηκαν 13,601 γονίδια από το συνολικό μέγεθος του γενώματος της που είναι 180Mbp (Berkeley Drosophila Genome Project). Στον δάκο, που το μέγεθος του γονιδιώματός του αναμένεται παρεμφερές με εκείνο της Μεσογειακής μύγας (~540Mbp, Gomulski et al., 1997) αναμένεται να περιέχει ένα παρόμοιο ποσοστό γονιδίων. Όπως προαναφέρθηκε όμως, στο δάκο έχει αποκαλυφθεί ένας μικρός αριθμός από τα γονίδια του ακόμα.

Στην δεύτερη κατηγορία ανήκει το επαναλαμβανόμενο DNA, που αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό του γονιδιώματος και διαχωρίζεται στο μεσοσυνδεόμενο και το ταχυσυνδεόμενο DNA (Εικ.10).

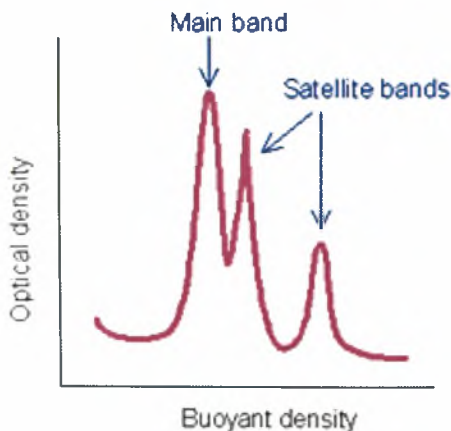
Στο μεσοσυνδεόμενο (moderately repetitive DNA) η επαναληψιμότητα των αλληλουχιών κυμαίνεται από 2-10.000 φορές (Genes IX). Αποτελείται από λειτουργικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που συγκροτούν οικογένειες που είναι διάσπαρτες ή συνεχόμενες στο γονιδίωμα αλλά και από ακολουθίες που η λειτουργία

τους δεν έχει διευκρινιστεί. Κάθε οικογένεια συνήθως αποτελείται από παρόμοια και όχι πανομοιότυπα αντίγραφα. Στο λειτουργικό μεσοσυνδεόμενο DNA υπάγονται τα tDNA γονίδια, τα rDNA, τα γονίδια ιστονών, ρυθμιστικά γονίδια και άλλα. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων απαιτούνται σε ασυνήθιστα μεγάλες ποσότητες γι' αυτό και υπάρχουν σε πολλά αντίγραφα (Κλασική και μοριακή γενετική). Το μεσοσυνδεόμενο DNA με άγνωστη λειτουργία αναφέρεται στα μεταθετά στοιχεία που βρίσκονται διάσπαρτα στο γονιδίωμα.

Στο ταχυσυνδεόμενο (highly repetitive DNA) η επαναληψιμότητα των αλληλουχιών κυμαίνεται από 10.000 φορές έως πολλά εκατομμύρια σε κάθε απλοειδή χρωμοσωματική σειρά και μάλλον δεν είναι ή είναι φορέας ελάχιστων πληροφοριών για τη σύνθεση πρωτεϊνών. Για τη λειτουργία του κλάσματος αυτού διατυπώθηκαν πολλές υποθέσεις αλλά καμία δεν φαίνεται πλήρως εξακριβωμένη. Η πλειονότητα τους φαίνεται πως σχετίζεται με την οργάνωση της δομής των χρωμοσωμάτων, τη σύναψη των ομολόγων χρωματοσωμάτων στη μείωση και τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων (Genomes). Το ταχυσυνδεόμενο DNA ουσιαστικά αναφέρεται στο δορυφορικό DNA (satellite DNA).

1.4 Δορυφορικό DNA

Το δορυφορικό DNA ονομάστηκε έτσι γιατί το πρότυπο των ζωνών κατά την τεχνική της υπερφυγοκέντρωσης στο γενετικό υλικό των ευκαρυωτικών δίνει εκτός από την κύρια ζώνη, μία ή περισσότερες ζώνες σε διαφορετικές θέσεις που αποτελούν το δορυφορικό γενετικό υλικό (Εικ.11). Το DNA αυτό έχει επαναληψιμότητα από 10.000 φορές έως πολλά εκατομμύρια σε κάθε απλοειδή πυρήνα ανάλογα με τον οργανισμό και εντοπίζεται συνήθως σε ετεροχρωματινικές περιοχές όπως τα κεντρομερή, τα χρωμόκεντρα και τα τελομερή (Genes VIII). Εχει γίνει διαχωρισμός ανάλογα με το μέγεθος της επανάληψης σε μινι- και μικρο- δορυφορικό DNA.



Εικόνα 11. Χρησιμοποιώντας την μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης (πυκνότητα επίπλευσης (buoyant density) – εξαρτάται από το περιεχόμενο G·C), τα τμήματα του DNA διαχωρίζονται σε μία κύρια ζώνη και σε μια ζώνη που αποτελεί το δορυφορικό DNA (Genes VII).

Στους μινι-δορυφόρους, η επανάληψη είναι 10bp-100bp και το μήκος της μπορεί να είναι μεγαλύτερο από 20kb. Αναφέρονται αλλιώς ως εν σειρά επαναλήψεις μεταβλητού αριθμού (VNTRs, variable number tandem repeats) και λόγω της μεγάλης γενετικής ποικιλότητας που παρουσιάζουν, έχουν καθιερωθεί ως δείκτες σε μελέτες χαρτογράφησης και πληθυσμιακών αναλύσεων (Severine et al., 2003). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι το μινι-δορυφορικό DNA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε δομικά στοιχεία των χρωμοσωμάτων, αφού έχουν εντοπιστεί στα τελομερή. Επίσης, συμμετέχουν στην ρύθμιση της μετάφρασης, αφού εντοπίζονται στην 5'- περιοχή γονιδίων που σχετίζονται μ' αυτή (Kennedy et al., 1995). Ο αριθμός των επαναλήψεων στους μινι-δορυφόρους ποικίλλει, ως αποτέλεσμα κυρίως άνισου διασκελισμού στο στάδιο της μείωσης, αφού φαίνεται ότι τα στοιχεία αυτά βρίσκονται 'δίπλα' σε σημεία-hot spots που η διπλή αλυσίδα είναι πιο εύκολο να σπάσει (DSBs, double-strand breaks) (Vergnaud et al., 2000). Η ποικιλότητα του αριθμού των επαναλήψεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των κληρονομικών σχέσεων με την τεχνική του αποτυπώματος DNA (DNA fingerprinting) (Jeffreys et al., 1985).

Οι μικρο-δορυφόροι είναι απλές εν σειρά επαναλήψεις (STRs, simple tandem repeats), με μονάδα επανάληψης μικρότερη από 13bp και με μήκος από 150kb. Συνήθως η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία περιέχει 2-4 νουκλεοτίδια και επαναλαμβάνεται 10-100 φορές. Η λειτουργικότητα του μικρο-δορυφορικού DNA παραμένει ένα μυστήριο, όμως πιστεύεται από διάφορα δεδομένα ότι πιθανόν παίζει ρόλο σε λειτουργίες του κυττάρου όπως ο ανασυνδυασμός (Benet et al., 2000) και η ρύθμιση της μετάφρασης (Martin et al., 2005). Παρ' όλα αυτά το σίγουρο είναι ότι έχει φανεί χρήσιμο εργαλείο στα χέρια των γενετιστών για την αποκάλυψη φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ ειδών αλλά και μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους. Ο αριθμός των επαναλήψεων του δορυφορικού DNA μπορεί να μεταβληθεί λόγω της ολίσθησης της DNA πολυμεράσης κατά την διάρκεια της αντιγραφής και με αυτό τον τρόπο να γίνει μια ένθεση της μονάδας επανάληψης ή σπανιότερα μια έλλειψη. Οπότε κάθε άτομο του ίδιου είδους διαθέτει ένα μοναδικό γενετικό προφίλ όσον αφορά τον αριθμό των επαναλήψεων τέτοιων στοιχείων.

Είναι φανερό λοιπόν ότι παίζουν ένα σημαντικό ρόλο σε φυλογενετικές και πληθυσμιακές μελέτες. Επιπρόσθετα, κληρονομούνται ως συνυπάρχοντες Μεντελικοί δείκτες, γεγονός που καθιστά εφικτή τη διάκριση αλληλομόρφων πατρικής και μητρικής προέλευσης και επειδή είναι διάσπαρτοι στο γονιδίωμα, δίνουν τη δυνατότητα μελέτης της εξέλιξης ολόκληρου του γονιδιώματος (Κλασική και μοριακή

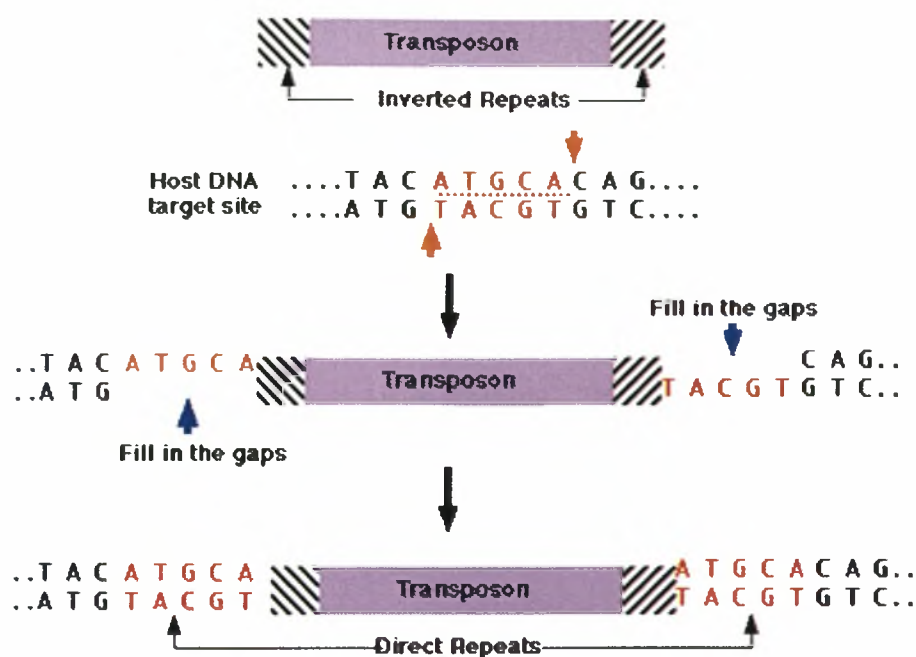
γενετική).

Στο *Bactrocera oleae*, έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί 64 αλληλουχίες μικροδορυφορικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν σε αναλύσεις της πληθυσμιακής δομής και της γενετικής ροής Μεσογειακών πληθυσμών του εντόμου καθώς και στη διερεύνηση της πορείας εξάπλωσης του στη λεκάνη της Μεσογείου (Augoustinos et al., 2005).

1.5 Μεταθετά στοιχεία

Τα μεταθετά στοιχεία (TE-Transposable Elements) ή αλλιώς τρανσποζόνια είναι διακριτές αλληλουχίες που βρίσκονται μέσα στο γονιδίωμα, οι οποίες είναι κινητές, δηλαδή ικανές να μεταφέρονται από μόνες τους από μια περιοχή του γονιδιώματος σε άλλη, γι' αυτό και συναντώνται σε μεγάλο αριθμό επαναλήψεων το καθένα. Η λειτουργία των στοιχείων αυτών δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, και θεωρείται ότι υπάρχουν μόνο για να διατηρούν τον εαυτό τους, γι' αυτό και αποκαλούνται εγωιστικά (selfish DNA), παρ' όλα αυτά αποτελούν μια σημαντική πηγή ποικιλότητας. Τα τρανσποζόνια κατατάσσονται σε δύο γενικές κατηγορίες, σ' αυτά που ονομάζονται DNA τρανσποζόνια (τάξης II τρανσποζόνια) και κωδικοποιούν πρωτεΐνες ικανές να αλληλεπιδράσουν άμεσα με το DNA, έτσι ώστε τα στοιχεία αυτά να μπορούν να μετακινηθούν εντός του γονιδιώματος και στα τρανσποζόνια που μετατίθενται με ενδιάμεσο στάδιο το RNA και ονομάζονται ρετρομεταθετά (τάξης I τρανσποζόνια), αφού σχετίζονται με τους ρετροϊούς.

Τα DNA τρανσποζόνια φέρουν ανάστροφες επάκριες επαναλήψεις που εμπεριέχουν την κωδικοποιούσα περιοχή μιας τρανσποζάσης και δημιουργούν ομόρροπες επαναλήψεις στο DNA που βρίσκεται εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης (Eικ12). Η τρανσποζάση είναι ένα ένζυμο που αναγνωρίζει την θέση στόχο της μετάθεσης και την κόβει στα άκρα της, όπως και αυτά του τρανσποζονίου για να πραγματοποιηθεί η μετάθεση. Υπάρχουν τρανσποζάσες που αναγνωρίζουν εξειδικευμένες αλληλουχίες στη θέση στόχο και άλλες που μπορούν να μεταθέσουν το τρανσποζόνιο σε οποιαδήποτε θέση του γονιδιώματος (Molecular Cell biology).



Εικόνα 12. Μετάθεση DNA τρανσποζονίου στην θέση στόχο του γονιδιώματος.

Μπορούν να μετατεθούν με τον μηχανισμό της ενδομετάθεσης, όπου αρχικά αντιγράφονται και έπειτα το αντίγραφο εισέρχεται στην νέα θέση ένθεσης ή με συντηρητική ενδομετάθεση όπου δεν αντιγράφονται αλλά αποκόπτονται από μια θέση και εισέρχονται σε μία καινούργια (cut and paste transposons). Γίνεται αντιληπτό ότι με τον μηχανισμό της ενδομετάθεσης μπορεί να αυξηθεί ο αριθμός των αντιγράφων ενός DNA τρανσποζονίου (Molecular biology). Το ίδιο ισχύει και για τον μηχανισμό της συντηρητικής ενδομετάθεσης, όταν όμως συμβαίνει κατά την διάρκεια της φάσης S (αντιγραφή DNA) μίτωσης στο κύτταρο. Συγκεκριμένα, συμβαίνει όταν το τρανσποζόνιο που πρόκειται να μετατεθεί προέρχεται από την μία αδερφή χρωματίδα που έχει ήδη αντιγραφεί και ο στόχος του είναι μια περιοχή που δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμα αντιγραφή, οπότε έχουμε αύξηση κατά ένα αντίγραφο. Αν αυτή η διαδικασία πραγματοποιηθεί κατά την διάρκεια της φάσης S στη μείωση, δύο από τα τέσσερα γαμετικά κύτταρα θα έχουν ένα επιπλέον αντίγραφο. Η επανάληψη αυτής της διαδικασίας έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση ενός μεγάλου αριθμού αντιγράφων DNA τρανσποζονίων στο γονιδίωμα των οργανισμών (Molecular biology).

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία απαντώνται μόνο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η γενική τους οργάνωση μοιάζει με αυτή των προϊόντων των ρετροϊών (retroviruses), με κύρια διαφορά ότι τα ρετρομεταθετά δεν έχουν ανεξάρτητη μολυσματική μορφή οπότε δεν μετακινούνται ανάμεσα σε κύτταρα. Τα απλούστερα στοιχεία αυτού του είδους

τρανσποζονίων δε διαθέτουν από μόνα τους ενεργότητα η οποία στηρίζει την μετάθεση, αλλά φέρουν αλληλουχίες που αναγνωρίζονται ως υποστρώματα μετάθεσης από άλλα ενεργά στοιχεία. Τα ρετρομεταθετά δημιουργούν στη θέση ένθεσης τους στο DNA-στόχο βραχείες ομόρροπες επαναλήψεις όπως τα DNA τρανσποζόνια. Διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: τα μέλη της ιϊκής υπερικογένειας (viral superfamily), τα LINEs (Long interspersed nuclear elements) και τα μέλη της μη ιϊκής υπερικογένειας (nonviral superfamily) (Κλασική και μοριακή γενετική).

Τα μέλη της ιϊκής υπερικογένειας κωδικοποιούν ενεργότητες αντίστροφης μεταγραφάσης και διαθέτουν LTR (LTR retrotransposons). Τα LTRs (long terminal repeats) είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που πλαισιώνουν ολόκληρη την κωδικοποιούσα περιοχή, η οποία περιλαμβάνει ένζυμα και δομικές πρωτεΐνες (Ericka et al., 2004). Το gag γονίδιο είναι αυτό που κωδικοποιεί δομικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν το σωματίο όπως αυτό των ιών (VLP-virus like particle), όπου εκεί λαμβάνει χώρα η αντίστροφη μεταγραφή. Το pol γονίδιο κωδικοποιεί μία πρωτεάση που διασπά την pol-πολύπρωτεΐνη, το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης και μια ιντεργκράση που ενσωματώνει το cDNA στο γένωμα (Ericka et al., 2004). Τα καλύτερα χαρακτηρισμένα είναι τα στοιχεία Ty του ζυμομύκητα και τα στοιχεία copia της *Drosophila*.

Τα LINEs έχουν και αυτά ενεργότητα αντίστροφης μεταγραφάσης αλλά δεν διαθέτουν LTR (non-LTR retrotransposons). Ένα LINE περιέχει μία 5'UTR αμετάφραστη περιοχή, 2 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) και μία 3'UTR περιοχή. Έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από 5kb και κωδικοποιούν 2 πρωτεΐνες (Deininger PL et al., 2002). Η μία έχει την ικανότητα να δεσμεύει το μονόκλωνο RNA και η άλλη κωδικοποιεί το ένζυμο και δράση αντίστροφης μεταγραφάσης και ενδονουκλεάσης. Χρησιμοποιούν διαφορετικό μηχανισμό για την εκκίνηση του ενζύμου σε σχέση με τους ρετροϊούς. Προκύπτουν από μετάγραφα της RNA πολυμεράσης II. Ένα μέρος των στοιχείων αυτών στο γονιδίωμα είναι πλήρως λειτουργικό και μπορεί να μετατίθεται αυτόνομα. Άλλα στοιχεία φέρουν μεταλλάξεις και μπορούν να μετατεθούν μόνο ως αποτέλεσμα ενός trans-δραστικού αυτόνομου στοιχείου. Τα LINEs χρησιμοποιούνται για να δημιουργούν γενετικά αποτυπώματα (genetic fingerprint).

Τα μέλη της μη ιϊκής υπερικογένειας δεν εμφανίζουν LTR (non-LTR retrotransposons) και δεν διαθέτουν ενεργότητα αντίστροφης μεταγραφάσης. Προέρχονται από κυτταρικά μετάγραφα και δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες με λειτουργίες μετάθεσης. Τα πιο γνωστά μέλη της οικογένειας είναι τα SINEs (Short

interspersed nuclear elements), που έχουν μέγεθος μικρότερο από 500bp (Dictionary of Genetics) και προέρχονται από μετάγραφα της RNA πολυμεράσης III. Τα SINEs από πρόσφατες μελέτες φάνηκε ότι διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των γονιδίων, στη δομή και στα επίπεδα μεταγραφής τους.

Τέλος, υπάρχουν τα MITEs (Miniature Inverted-repeat Transposable Elements), τα οποία είναι μη-αυτόνομα τρανσποζόνια αφού δεν διαθέτουν γονίδια για την μετάθεση τους. Αρχικά, τα είχαν κατατάξει στην κατηγορία των SINEs (Unsal K. et al, 1995) που όπως διαπιστώθηκε ήταν μια εσφαλμένη κατηγοριοποίηση. Τα MITEs τελικά εισάχθηκαν στα τάξης II τρανσποζόνια (Feschotte C. et al, 2002). Η δομή τους έχει μικρό μέγεθος (λιγότερο από 600bp), η αλληλουχία τους είναι πλούσια σε Α·Τ, διαθέτουν ανεστραμμένες αλληλουχίες στα άκρα (TIRs-Terminal Inverted Repeats), θέσεις αντιγραφής (TSDs-Target Sites Duplications) και μια εσωτερική μη-κωδικοποιούσα περιοχή. Τα MITEs βρέθηκαν σε πολλά είδη ζώων όπως το *Caenorhabditis elegans*, τα κουνούπια, το *Xenopus*, τα ψάρια, τον άνθρωπο (Feschotte C. et al., 2002) και τη *Drosophila* (Holyoake AJ et al., 2003). Διάφορα MITEs που έχουν χαρακτηριστεί φαίνεται να παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με κάποιες από τις υπεροικογένειες των DNA τρανσποζονίων όπως τις Tc1/mariner, PIF/Harbinger, piggyBac or hAT (Feschotte C. et al., 2002). Οι οικογένειες των mariner, Tc1, hAT και gypsy/Ty3 τρανσποζονίων έχουν βρεθεί σε μεγάλο ποσοστό στα γονιδιώματα εντόμων με ιατρική και οικονομική σημασία και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες (Gomulski LM et al., 2004).

Συνοψίζοντας, συμπαραίνουμε ότι τα TEs είναι η κύρια δύναμη της γενετικής ποικιλομορφίας και εξέλιξης. Στην τάξη των δίπτερων, εκεί που ανήκει και ο δάκος, τα TEs έχει φανεί να εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η υβριδική δυσγένεση, η οριζόντια μεταφορά, το εναλλακτικό μάτισμα γονιδίων, η χρωμοσωμική αναδιάταξη, η τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση, η δημιουργία ετεροχρωματίνης ακόμα και στη δομή μιας νέας μορφής τελομερών (Kidwell MG., 2005).

1.6 Σκοπός εργασίας

Όπως παρουσιάστηκε, ο δάκος είναι ένα έντομο εξαιρετικής οικονομικής σημασίας, γι' αυτό θα πρέπει να αναπτυχθούν αποτελεσματικές μέθοδοι δακοπροστασίας. Η περιορισμένη γνώση της μοριακής οργάνωσης του εντόμου αποτελεί εμπόδιο για την εύρεση γενετικών μεθόδων διαχείρισης. Επιπρόσθετα, ο δάκος διαθέτει μικρό χρωμόσωμα Υ σε σύγκριση με άλλα έντομα, οπότε η οργάνωση του θα έδινε την δυνατότητα ανάλυσης γονιδίων φυλλοκαθορισμού και την δυνατότητα γενετικής τροποποίησης του εντόμου. Παρατηρείται λοιπόν ότι η ανάλυση της οργάνωσης του γονιδιώματος του *Bactrocera oleae* είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η εργασία που διεκπεραιώθηκε είχε ως στόχο την συνεισφορά στη γνώση της μοριακής οργάνωσης του εντόμου.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

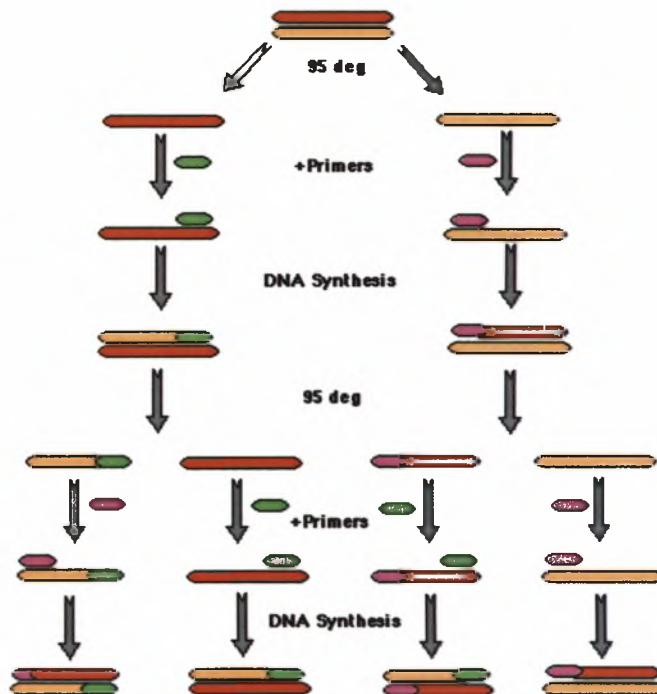
2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Mullis, ο οποίος βραβεύτηκε με Nobel για την τεχνική αυτή το 1993. Με τη χρήση της PCR τεχνολογίας, το DNA μιας συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί δισεκατομμύρια φορές υπό τον όρο ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η αλληλουχία του γονιδίου (ή του DNA θραύσματος) είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (5' και 3' primers) ώστε το καθένα να είναι συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA (Molecular Cloning: A Laboratory Manual). Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιούνται ως εκκινητήρες (primers) και πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του DNA θραύσματος που πρόκειται να ενισχυθεί. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι βακτηριακής προέλευσης αφού απομονώνεται από το θερμοφίλο *Thermus aquaticus*, γεγονός που της προσδίδει ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες. Επιπρόσθετα, απαιτείται η προσθήκη 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) για το στάδιο της αντιγραφής καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου (που περιέχει την απαραίτητη συγκέντρωση ιόντων Mg^{+2} για την ενεργοποίησή του). Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. Την αποδιάταξη του DNA (denaturation)
2. Τη προσαρμογή των εκκινητήρων στο DNA εκμαγείο (annealing)
3. Την επιμήκυνση των εκκινητήρων (extension).

Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και γίνεται στις μέρες μας αυτόματα από ειδικά μηχανήματα (thermal cyclers). Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 94°C-96°C. Στη συνέχεια οι εκκινητήρες σε περίσσεια προσαρμόζονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους 50°C – 64°C. Ακολουθεί επώαση στους 72°C για την επιμήκυνση των εκκινητήρων από την θερμοάντοχη πολυμεράση παρουσία των τεσσάρων dNTPs. Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι

νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για in vitro σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα που το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στην μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητήρων απόσταση. Στη πράξη 20 με 30 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA θραύσματος. Σε κάθε κύκλο που διαρκεί περίπου πέντε λεπτά η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται (Εικ.13).



Εικόνα 13. Η αντίδραση PCR. Αρχικά το DNA αποδιατάσσεται (denaturation), πραγματοποιείται η δέσμευση των εκκινητών (annealing) και έπειτα η αντιγραφή του DNA(extension). Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία.

Αντιδραστήρια

DNA (10 ng)

Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10x Buffer)

dNTPs (2.5mM each)

Ζευγάρι εκκινητών (10pmol/μl each)

Τaq πολυμεράση (5u/μl)

ddH₂O

Μεθοδολογία

Σε ένα PCR tube προστίθεται αρχικά το δείγμα DNA, στην συνέχεια 1.5μl Buffer (1x), 0.7μl από κάθε ένα εκκινητή (0.7μM), 1.2μl dNTPs (200μM each), 0.2μl Taq pol (1u) και τέλος προσθέτουμε ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος της αντίδρασης να φτάσει τα 15μl. Κατά την προετοιμασία της διαδικασίας όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να διατηρούνται στον πάγο. Προσθήκη δειγμάτων στην ρυθμισμένη αναλόγως συσκευή PCR.

Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή

ΣΤΑΔΙΑ PCR	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΚΥΚΛΟΣ
ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ ΑΡΧΙΚΟΥ DNA	94 °C	4 min	1
ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗ DNA	94 °C	30 sec	30
ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	*	30 sec	
ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΝ	72 °C	*	
ΤΕΛΙΚΟΣ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΣ	72 °C	7 min	1

Η θερμοκρασία του υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται από το σημείο τήξης (T_m) του κάθε εκκινητή. T_m ορίζεται η θερμοκρασία εκείνη που το 50% του DNA είναι αποδιαταγμένο και υπολογίζεται από τον εξής τύπο: 4x(G+C)+2x(A+T). Αφού υπολογίσουμε το T_m του κάθε εκκινητή αφαιρούμε από τον καθένα 5μονάδες και επιλέγουμε ως θερμοκρασία υβριδισμού την μικρότερη από αυτές τις δύο.

Ο χρόνος πολυμερισμού των αλυσίδων DNA κυμαίνεται από 15sec-1.5min. Αυτό εξαρτάται από το μέγεθος του DNA προϊόντος που αναμενουμε να ενισχυθεί. Όσο μεγαλύτερο είναι το τμήμα τόσο περισσότερο χρόνο χρειάζεται το στάδιο.

2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό κομματιών DNA. Η τεχνική είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει μίγματα κομματιών DNA που δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές. Επιπλέον η θέση του DNA στο πήκτωμα μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα. Οι ζώνες του DNA χρωματίζονται με μικρή συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου (φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις). Μπορούμε έτσι να δούμε με υπεριώδες φως ακόμα και 1ng DNA (Molecular Cloning: A Laboratory Manual). Επιπρόσθετα, το πρότυπο των ζωνών που δημιουργείται επιτρέπει τον προσδιορισμό του μεγέθους μετά από σύγκριση με τους μάρτυρες μοριακού βάρους. Η ηλεκτροκινητική ικανότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους:

- A) Το μέγεθος του DNA
- B) Τη συγκέντρωση της αγαρόζης
- Γ) Την στερεοδιάταξη του DNA
- Δ) Την ένταση του ρεύματος

Υλικά - Διαλύματα

Αγαρόζη

Διάλυμα TBE Buffer 0.5X ή 1X

Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)

Μάρτυρας (DNA Ladder)

Δείγματα DNA

Loading Buffer

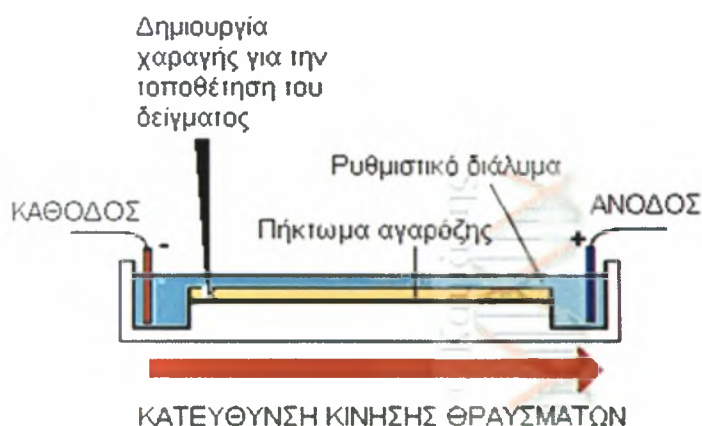
Μεθοδολογία

✓ Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση

1. Για την παρασκευή 130ml gel, προσθέτουμε 130ml διαλύματος TBE 0.5X (ή 1X) σε 1.3 gr σκόνης αγαρόζης που έχουμε τοποθετήσει σε μια κωνική φιάλη.
2. Το διάλυμα θερμαίνεται με διαδοχικές κινήσεις μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη.
3. Αφού κρυώσει (περίπου η θερμοκρασία του να είναι 50°C), προσθέτονται 1.5μl

βρωμιούχου αιθιδίου και ανακινούμε την κωνική φιάλη.

4. Το διάλυμα της αгарόζης μεταφέρεται στη στεγανοποιημένη βάση της ηλεκτροφορητικής συσκευής. Προηγουμένα έχουμε τοποθετήσει κάθετα στην κατάλληλη θέση τη “χτένα” που θα δημιουργήσει θήκες για την φόρτωση των δειγμάτων όταν πήξει η αгарόζη.
5. Όταν πήξει η αгарόζη απομακρύνεται η “χτένα” και το πήκτωμα βυθίζεται στην συσκευή που έχει πληρωθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα (TBE), ώστε να καλύπτεται πλήρως (Εικ.14).



Εικόνα 14. Συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα τοποθετούνται στις χαραγές πάνω στο πήκτωμα αгарόζης, το οποίο καλύπτεται από ρυθμιστικό διάλυμα. Το DNA των δειγμάτων θα κινηθεί προς την άνοδο λόγω του αρνητικού φορτίου του.

6. Προετοιμάζουμε τα δείγματα που θα ηλεκτροφορηθούν με την προσθήκη Loading Buffer (1μl ανά 6μl δείγματος). Το Loading Buffer περιέχει μια μπλε χρωστική (μπλε της βρωμοφαινόλης και/ή κυανού της ξυλόζης) που φέρει αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα η κατεύθυνση μετακίνησης του να είναι προς το ηλεκτρόδιο της ανόδου όπως και του DNA. Με αυτόν τον τρόπο είναι εύκολη η παρατήρηση των δειγμάτων κατά την διαδικασία. Επιπλέον, το Loading Buffer περιέχει γλυκερόλη που εμποδίζει την διάχυση των δειγμάτων κατά την φόρτωση τους. Η ποσότητα που μπορούμε να φοτρώσουμε στις θήκες που έχουν σχηματιστεί εξαρτάται από το μέγεθος των δοντιών της χτένας, στην περίπτωση μας είναι μέχρι 25μl.
7. Στη συνέχεια συνδέονται τα ηλεκτρόδια της συσκευής και εφαρμόζεται τάση 90V. Η διαδικασία ολοκληρώνεται σε περίπου 30min.

8. Το πήκτωμα εκτίθεται σε συσκευή υπεριάδους ακτινοβολίας ώστε να γίνει ορατός ο διαχωρισμός των ζωνών του DNA.

2.3 Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεασών που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και πέπτουν το DNA με επαναλήψιμο τρόπο, δηλαδή πάντοτε στο ίδιο σημείο. Αποτελούν ιδανικά αντιδραστήρια για την κλωνοποίηση και χαρτογράφηση του DNA, αφού κάθε αναγνωριζόμενη αλληλουχία (θέση περιορισμού – restriction site) επέχει θέση ορόσημου πάνω στο DNA.

Απομονώνονται από βακτήρια και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η προστασία του βακτηρίου από ιούς. Τα ένζυμα αυτά πέπτουν το ξένο DNA, ενώ το DNA των βακτηρίων προστατεύεται λόγω της μεθυλίωσης που υφίσταται από τα ίδια ένζυμα περιορισμού (τύπου I, III) ή από ειδικές μεθυλάσες. Τα περισσότερα από τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν ειδικές παλίνδρομες αλληλουχίες 4 έως 8 βάσεων και υδρολύουν έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής. Ανάλογα με τον τρόπο πέψης δημιουργούν τμήματα DNA με συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα.

Αντιδραστήρια

Δείγμα DNA

Ένζυμο/α

Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer 10x)

ddH₂O

Μεθοδολογία

1. Σε ένα eppendorf τοποθετούμε το δείγμα DNA και έπειτα προσθέτουμε το Buffer (1x), το ddH₂O μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης και τελευταίο το ένζυμο/α (1unit ενζύμου πέπτει 1μg λDNA). Κατά την προετοιμασία της διαδικασίας όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να διατηρούνται στον πάγο.

2. Το δείγμα επωάζεται για 1h στις θερμοκρασία που είναι κατάλληλη για την δράση του κάθε ενζύμου.

Για την πέψη φαγικού DNA απαιτείται η προσθήκη BSA 1x και η διάρκεια της διαδικασίας είναι 4h. Το BSA (Bovine Serum Albumin) προστίθεται όταν είναι απαραίτητη η απουσία ενδονουκλεασών.

2.4 Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Τα μόρια DNA που διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μπορούν να ανακτηθούν με τη χρήση του Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System της εταιρείας Promega. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε προτείνεται στο εγχειρίδιο της εταιρείας.

Υλικά - Διαλύματα

Membrane Binding Solution

Membrane Wash Solution

Nuclease-Free Water

Wizard[®] SV Minicolumns

Collection Tubes

Μεθοδολογία

1. Αρχικά απομονώνεται από το gel αγαρόζης η ζώνη που αντιστοιχεί στο τμήμα DNA που επιθυμούμε. Το τμήμα του DNA δεν πρέπει να ξεπερνάει τις 10kb.
2. Το κομμάτι του gel τοποθετείται σε ένα eppendorf και προσδιορίζεται το βάρος του. Για κάθε 10mg του gel προσθέτουμε 10μl Membrane Binding Solution.
3. Τοποθετούμε το eppendorf σε υδατόλουτρο στους 50°C -65°C μέχρι να διαλυθεί το gel.
4. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο του eppendorf αφού πραγματοποιήσουμε ελαφρύ vortex στον ειδικό σωλήνα συλλογής (Minicolumn) και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1'.
5. Φυγοκέντρηση στις 16.000 rpm για 1min. Απομάκρυνση διαλύματος από τον σωλήνα συλλογής.
6. Προσθήκη 700μl Membrane Wash Solution.
7. Φυγοκέντρηση στις 16.000 rpm για 1min. Απομάκρυνση διαλύματος από τον σωλήνα συλλογής.
8. Προσθήκη 500μl Membrane Wash Solution.
9. Φυγοκέντρηση στις 16.000 rpm για 5min. Απομάκρυνση διαλύματος από τον σωλήνα συλλογής.
10. Φυγοκέντρηση στις 16.000 rpm για 1min με ανοικτό το καπάκι της φυγόκεντρου

για απομάκρυνση της αιθανόλης που μπορεί να παρέμεινε.

12. Μεταφορά του σωλήνα συλλογής σε ένα eppendorf και προσθήκη 50μl Nuclease-Free Water. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min.
13. Φυγοκέντρηση στις 16.000 rpm για 1min. Απόρριψη του σωλήνα συλλογής και αποθήκευση του eppendorf που περιέχει το επιθυμητό DNA στους 4°C ή στους -20°C.

2.5 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (Ligation)

Η αντίδραση ligation καθιστά δυνατή την κλωνοποίηση μιας αλληλουχίας DNA σε καταλλήλους φορείς, όπως είναι τα πλασμίδια. Στα μοριακά εργαστήρια ως φορείς χρησιμοποιούνται τεχνητά πλασμίδια, που έχουν μέγεθος περίπου 3Kb, που περιέχουν ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό και τέλος διαθέτουν μια περιοχή (polylinker) 100 νουκλεοτιδίων περίπου που περιλαμβάνει θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού. Η αλληλουχία αυτή επιτρέπει την κλωνοποίηση στο πλασμίδιο τμημάτων DNA που τα άκρα τους περιλαμβάνουν κάποιες από τις περιοριστικές θέσεις που διαθέτει ο polylinker.

Αφού λοιπόν έχουν πέψη και τον φορέα αλλά και το επιθυμητό ένθεμα με το καταλληλό ένζυμο περιορισμού, με την βοήθεια του ενζύμου T₄ ligase συνδέονται τα άκρα των τμημάτων αυτών. Η T₄ ligase παράγεται από τον βακτηριοφάγο T₄ και καταλύει τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών. Ωστόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντίδραση απευθείας κάποιο προϊόν PCR αλλά απαιτείται κατάλληλα σχεδιασμένος φορέας.

Επειδή κατά την διάρκεια της αντίδρασης τόσο τα εξωγενή τμήματα DNA, όσο και τα πλασμίδια έχουν την τάση να επανακυκλοποιούνται, απαιτείται προσεκτικός προσδιορισμός των συγκεντρώσεων του φορέα και του ενθέματος. Συγκεκριμένα πρέπει να βρίσκονται σε αναλογία 3(ένθεμα):1(φορέας). Επιπρόσθετα, η ποσότητα του ενθέματος εξαρτάται κάθε φορά από το είδος του φορέα που χρησιμοποιείται και υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

Απαιτούμενη ποσότητα ενθέματος (ng)= ποσότητα φορέα (ng) x μέγεθος ενθέματος (Kb)/μέγεθος φορέα (Kb) x 3/1.

Αντιδραστήρια

Δείγμα DNA

Πλασμιδιακός φορέας (40ng)

Ρυθμιστικό διάλυμα Buffer 10x

T₄ Ligase (1u/μl)

ddH₂O

Μεθοδολογία

1. Σε ένα erppendorf τοποθετείται η ποσότητα DNA που έχει υπολογιστεί και διαδοχικά προστίθενται πλασμιδιακός φορέας (40ng), buffer 1x (1.0μl), το ddH₂O με τελευταία την προσθήκη T₄ DNA λιγάσης (1u) . Η ποσότητα ddH₂O αντιστοιχεί σε αυτή που απαιτείται για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος (10μl) της αντίδρασης.
2. Επωάζουμε το δείγμα στους 22°C για 2.5h.

Κατά την διαδικασία αντίδρασης σύνδεσης με τυφλά άκρα χρησιμοποιείται ο φορέας EcoRV. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης αυξάνει στα 20μl και γίνεται προσθήκη του αντιδραστήριου PEG 50% 4000, το οποίο μεγιστοποιεί τη δράση της T₄ λιγάσης. Τέλος, προστίθεται 5u T₄ DNA λιγάσης.

2.6 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια (transformation)

Η ανάπτυξη των τεχνικών εισαγωγής ανασυνδυασμένου DNA σε κοινούς εργαστηριακούς οργανισμούς, όπως το βακτήριο *E.coli*, επέτρεψε την επιτυχή πραγματοποίηση των τεχνικών κλωνοποίησης. Χωρίς την εισαγωγή τους σε βακτήρια τα μόρια DNA που έχουν σχηματιστεί in vitro με DNA ligase (βλ. Ligation), θα καταστρέφονταν μέσα σε λίγες ώρες. Τα βακτηριακά κύτταρα είναι σε θέση να προσλαμβάνουν νουκλεϊκά οξέα σε μορφή ανθεκτική ως προς τη δράση νουκλεασών. Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής (εκλειπτική φάση) γίνεται ο ανασυνδυασμός του DNA με ομόλογες αλληλουχίες στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Μετά την ολοκλήρωση του, η γενετική πληροφορία που έχει ενσωματωθεί μπορεί να εκφραστεί με αποτέλεσμα την εμφάνιση του λειτουργικού μετασχηματισμένου κυττάρου. Ο φυσικός

μηχανισμός μετασχηματισμού απουσιάζει από το βακτήριο *E.coli*, γι' αυτό και η ικανότητα αυτή επάγεται τεχνητά με έκθεση των κυττάρων σε χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2) (προετοιμασία δεκτικών κυττάρων). Κατόπιν προστίθεται DNA (σχηματίζει ένα σύμπλοκο φωσφορικού υδροξυλίου του ασβεστίου, ανθεκτικό στη δράση βακτήριο DNAσών) και το μίγμα εκτίθεται σε υψηλή θερμοκρασία, οπότε τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν πλέον να ενσωματώσουν τα σύμπλοκα DNA. Μετά από καλλιέργεια σε πλούσιο θρεπτικό υλικό τα μεταβιβασμένα γονίδια εκφράζονται και τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιλέγονται και εκφράζονται με στρώση σε τρυβλία που φέρουν επιλεκτικό θρεπτικό υλικό.

Τα πλασμίδια που εισάγονται στα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα τους προσδίδουν ανθεκτικότητα σε ένα αντιβιοτικό. Με αυτό τον τρόπο επιζούν μόνο τα βακτήρια που έχουν μετασχηματιστεί. Επιπρόσθετα, το επιθυμητό ένθεμα έχει εισαχθεί στον polylinker του πλασμιδίου που εκεί είναι ενσωματωμένο το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*). Παρουσία X-gal (5-bromo-4chloro-3indolyl-p-D-galactosidase) στο θρεπτικό μέσο, το προϊόν του γονιδίου *lacZ* συμβάλλει στην εμφάνιση χαρακτηριστικού μπλε χρώματος στις βακτηριακές αποικίες μέσω της διάσπασης του πρώτου. Η είσοδος του ενθέματος διακόπτει το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου *lacZ* και εμποδίζει την έκφραση του, με αποτέλεσμα το X-gal να μη διασπάται και οι αποικίες που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο να εμφανίζονται άσπρες. Η παραπάνω διάκριση βρίσκει εφαρμογή στην επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων που περιέχουν τα ανασυνδυασμένο με το επιθυμητό ένθεμα πλασμίδια.

Αντιδραστήρια

Τρυβλία SOC άγαρ

Θρεπτικό μέσο SOB

Διάλυμα FSB

Διάλυμα DMSO

DNA (από αντίδραση σύνδεσης)

Διάλυμα δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*

Θρεπτικό μέσο SOC

Τρυβλία LB άγαρ/αμπικιλίνη

Διάλυμα X-gal (20 mg/ ml)

Διάλυμα IPTG (200 mg/ ml)

Μεθοδολογία

✓ Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*

1. Χρησιμοποιώντας έναν αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο επιστρώνεται τριβλίο SOB άγαρ με δείγμα πληθυσμού *E.coli* (από stock που διατηρείται σε συνθήκες -80°C) και επωάζεται για 16 ώρες στους 37°C.
2. Σε 2 ml υγρού θρεπτικού μέσου διαλύματος SOB ενοφθαλμίζεται μία αποικία και το μίγμα επωάζεται με ταυτόχρονη ανάδευση για 16 ώρες στους 37°C.
3. Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε 50ml διαλύματος SOB και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 2-3 ώρες. Παράλληλα ανά τακτά χρονικά διαστήματα (20-30min) ελέγχεται η ανάπτυξη των κυττάρων, φωτομετρώντας ποσότητα της καλλιέργειας σε μήκος κύματος 600 nm ώστε η οπτική απορρόφηση της (OD) να κυμαίνεται μεταξύ 0.4-0.5, τιμή που αντιστοιχεί σε 10^8 κύτταρα/ ml καλλιέργειας.
4. Στη συνέχεια τα κύτταρα αφού μεταφερθούν σε σωλήνες 25ml (propylene tubes, Falcon) διατηρούνται σε πάγο (0°C) για 10min.
5. Τα κύτταρα ανακτούνται με φυγοκέντριση στις 4000 rpm στους 4°C για 10 min.
6. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα αφήνεται για 1min να στεγνώσει.
7. Το ίζημα αναδυσάλυεται σε 20ml παγωμένου διαλύματος FSB και επωάζεται για 10min στον πάγο.
8. Ακολουθεί επανάληψη των σταδίων 5 και 6.
9. Το ίζημα αναδιαλύεται με ελαφρύ vortex σε 4ml παγωμένου διαλύματος FSB.
10. Για κάθε 4ml αναδιαλυμένων κυττάρων προσθέτονται 140μl DMSO (dimethyl sulfoxide), τα οποία αναμιγνύονται με ελαφριά ανακίνηση και αφήνονται στον πάγο για 15min.
11. Προσθέτονται επιπλέον 140μl DMSO (κρυοπροστατευτικό) και ακολουθεί ελαφριά ανάδευση.
12. Τέλος, τα κύτταρα μοιράζονται σε σωληνάκια erppendorf και διατηρούνται στους -80°C.

✓ Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων

1. Σε 200μl κυττάρων *E. coli* προστίθενται ½ DNA από το ligation (5% του όγκου των δεκτικών κυττάρων) και το δείγμα επωάζεται σε πάγο για 30min, αφού προηγηθεί ελαφριά ανάδευση για την ανάμιξη των συστατικών του.
2. Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους 42°C για 90sec.
3. Το δείγμα μεταφέρεται στον πάγο για 2min. Στο σημείο αυτό τα πλασμίδια εισέρχονται στα κύτταρα που υποστεί θερμικό σοκ (heat shock).
4. Στη συνέχεια το δείγμα προστίθεται σε 800μl θρεπτικού μέσου SOC και επωάζεται υπό ανάδευση (180 rpm) στους 37°C για μία ώρα.
5. Τα συνολικά 1000ml μοιράζονται σε σωληνάκια τύπου erppendorf, καθένα από τα οποία περιέχει 200μl και 800μl αντίστοιχα. Τα 800μl φυγοκεντρώνονται στις 2000 rpm για 4min και τα καθιζάνοντα κύτταρα αναδιαλύονται σε τελικό όγκο 200μl (αφαιρούνται 600μl υπερκείμενου υγρού).
6. Οι παραπάνω ποσότητες επιστρώνονται σε τριβλία με θρεπτικό μέσο LB άγαρ που περιέχουν αμικικιλίνη. Πριν την επίστρωση των κυττάρων, στην επιφάνεια των τριβλίων προσθέτονται προσθήκη 30μl X-gal και 3μl IPTG, ώστε να είναι δυνατή η επιλογή των αποικιών με το επιθυμητό πλασμίδιο.
7. Τέλος, τα τριβλία επωάζονται overnight στους 37°C.

2.7 Υγρές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων

Η ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε υγρό θρεπτικό μέσο. Με αυτή την διαδικασία είναι δυνατόν να χρησιμοποιήσουμε τα βακτηριακά κύτταρα για περαιτέρω επεξεργασία. Μπορούμε να επιβεβαιώσουμε τον μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια αλλά και να απομονώσουμε το DNA των πλασμιδίων αυτών για αναλυτικότερη μελέτη.

Διαλύματα

LB Broth θρεπτικό μέσο

Αντιβιοτικό αμπικιλλίνης

Μεθοδολογία

1. Για τη δημιουργία υγρών καλλιιεργειών ενοφθαλμίζονται αποικίες βακτηριακών κυττάρων σε θρεπτικό μέσο LB Broth που περιέχει το αντιβιοτικό αμπικιλλίνης (1 αποικία / 3 ml LB Broth). Τα κύτταρα που χρησιμοποιούμε για την δημιουργία υγρών καλλιιεργειών εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό (λόγω των πλασμιδίων). Οπότε είμαστε βέβαιοι ότι τα κύτταρα που αναπτύσσονται στον σωλήνα καλλιιεργειας είναι τα επιθυμητά.

2. Στη συνέχεια οι καλλιιεργειες επωάζονται σε ένα σωλήνα υπό ανάδευση (210 rpm) στους 37°C overnight.

Μπορούν να μεταφερθούν 800μl σε ένα eppendorf στο οποίο προστίθεται 50μl διάλυμα γλυκερόλης και έπειτα αποθηκεύεται στους -80°C (stock δείγμα).

2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια επιλέχθηκε η αλκαλική μέθοδος. Είναι απλή, πολύ εύχρηστη για την γρήγορη ανίχνευση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων από έναν πληθυσμό βακτηριακών αποικιών. Η μέθοδος συνίσταται στην αποδιάταξη, παρουσία NaOH και SDS, του χρωμοσωμικού DNA και των πρωτεϊνών που το συνδέουν, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό αδιάλυτου ιζήματος όταν γίνει εξουδετέρωση του διαλύματος με οξικό κάλιο. Η πλειονότητα του πλασμιδιακού DNA και του βακτηριακού RNA παραμένει διαλυτή και μπορεί να παραληφθεί μετά από φυγοκέντρηση στο υπερκείμενο. Έπειτα, πραγματοποιείται εκχύλιση με φαινόλη και κατακρήμνιση με αιθανόλη και τελικά αναδιάλυση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα TE-RNase, ώστε να απομακρυνθούν τα μόρια RNA.

Διαλύματα

Υγρή καλλιέργεια μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων (1.5ml)

Διάλυμα GET

Διάλυμα Alkali

Διάλυμα CH₃COOK pH? 4.8

Διάλυμα TE-RNase

Διαλύματα φαινόλης και χλωροφόρμιου

Παγωμένη αιθανόλη 70% και 100%

Διάλυμα CH₃COONa 0.3M

Γλυκογόνο

ddH₂O

Μεθοδολογία

1. Μεταφορά σε erpendorf (1.5ml) τις αποικίες της κορεσμένης βακτηριακής καλλιέργειας.
2. Φυγοκέντρηση 3min – 5000 rpm. Αφαιρούμε όσο γίνεται περισσότερο από το υπερκείμενο και κρατάμε το ίζημα (βακτήρια) στον πάγο.
3. Προσθήκη 100μl παγωμένου δ/τος GET. Ακολουθεί vortex (1min) και το αφήνουμε για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 200μl δ/τος Alkali . Ανακατεύουμε αναποδογυρίζοντας το erpendorf και το αφήνουμε στον πάγο 3 - 5min.
5. Προσθήκη 150μl παγωμένου δ/τος οξικού καλίου (CH₃COOK pH? 4.8). Ανάδευση στο vortex και το αφήνουμε στον πάγο 8 - 10min (εξουδετέρωση δ/τος Alkali).
6. Φυγοκέντρηση 10min – rpm max. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο erpendorf.

✓ Εκχύλιση με φαινόλη και χλωροφόρμιο

1. Στο δείγμα DNA (erpendorf με υπερκείμενο) προστίθεται ποσότητα ίσου όγκου μίγματος φαινόλης -χλωροφορμίου (1:1) και το μίγμα αναδεύεται έντονα με τη βοήθεια vortex.

2. Το μίγμα φυγοκεντρείται για 5min στις 13.000 rpm και η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι προσεκτικά ώστε να μη ληφθεί καθόλου μεσόφαση ή οργανική φάση.
3. Προστίθεται χλωροφόρμιο ίσου όγκου και επαναλαμβάνεται το στάδιο 2.
4. Η διαδικασία του σταδίου 3 πραγματοποιείται για ακόμα μία φορά και ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη.

✓ Κατακρήμνιση με αιθανόλη

1. Στο δείγμα DNA όγκου V προσθέτονται 2.5 V αιθανόλης 100%, 1/10 V διαλύματος CH_3COONa 3M και 0.5μl γλυκογόνου και το μίγμα διατηρείται για 15min στους -80°C .
2. Το μίγμα φυγοκεντρείται για 10min στις 13.000 rpm.
3. Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και προστίθεται αιθανόλη 70% ίση με 0.5 V.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5min στις 13.000 rpm και αφαίρεση του υπερκείμενου.
5. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και αναδιαλύεται σε 100μl TE-RNase. Το δείγμα, που αποθηκεύεται στους -20°C , αποτελείται από καθαρό πλέον πλασμιδιακό DNA.

2.9 Υβριδοποίηση κατά Southern

Ονομάστηκε έτσι από τον επιστήμονα που την ανακάλυψε, Edwin Southern. Είναι μια από τις κλασικότερες μεθόδους μοριακής βιολογίας. Με την τεχνική αυτή μπορεί να παρατηρηθεί η ύπαρξη συγκεκριμένων αλληλουχιών σε ένα DNA δείγμα (Southern, E.M., 1975). Το DNA δείγμα αφού πέπτει με ένζυμα περιορισμού, διαχωρίζεται σε ένα gel ηλεκτροφόρησης και μετά μεταφέρεται σε μια νάιλον μεμβράνη όπου εκεί υβριδίζεται με το ειδικά σημασμένο ανιχνευτή. Για να πραγματοποιηθεί αυτός ο υβριδισμός σημαίνει ότι ο ανιχνευτής βρήκε μία συμπληρωματική αλληλουχία στο DNA δείγμα (Southern, E.M., 1975). Για την παρατήρηση του υβριδισμού ο ανιχνευτής που είναι προσκολλημένος διαθέτει ειδικά μόρια που με την κατάλληλη επεξεργασία θα μας δώσουν σήμα στα σημεία αυτά.

Διαλύματα – Υλικά

Διάλυμα αποδιάταξης

Διάλυμα εξουδετέρωσης

Διάλυμα SSC 10x

4 Whatman

Μεμβράνη νάιλον

Διάλυμα προϋβριδοποίησης

SSDNA (10mg/ml)

Διάλυμα υβριδοποίησης

Σημασμένος ανιχνευτής

Διάλυμα Πλύσης 1

Διάλυμα Πλύσης 2

Διάλυμα A

Διάλυμα B

Διάλυμα C

Σύμπλοκο Streptavidin – Alkaline Phosphatase

NBT (Nitro Blue Tetrazolium Chloride)

BCIP (5-bromo 4-chloro-3-indolyl phosphate dissodium salt)

A. Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης

- Τοποθέτηση του πηκτώματος σε κατάλληλο δοχείο και κάλυψη με διάλυμα αποδιάταξης. Επώαση για 15min σε θερμοκρασία δωματίου αναδεύοντας ελαφρά. Απόχυση του διαλύματος. Επανάληψη του βήματος (το gel ξεπλένεται με H₂O).
- Προσθήκη διαλύματος εξουδετέρωσης. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20min αναδεύοντας ελαφρά. Απόχυση του διαλύματος. Επανάληψη του βήματος (το gel ξεπλένεται με H₂O).
- Προσθήκη διαλύματος 10 x SSC.

B. Προετοιμασία νάιλον μεμβράνης.

- Κόβεται η μεμβράνη περίπου στο μέγεθος του πηκτώματος, τέσσερα κομμάτια χαρτί Whatman και μια στοίβα χαρτοπετσέτες πάχους 2 εκατοστών στο μέγεθος του πηκτώματος. Η μεμβράνη "βρέχεται" με H₂O πριν τοποθετηθεί και μετά σε 10x SSC. Τα δύο πρώτα χαρτιά Whatman "βρέχονται" με το SSC. Τα άλλα δύο Whatman

τοποθετούνται στεγνά και επιπλέον πάνω από τις χαρτοπετσέτες τοποθετείται βάρος 500gr.

- Αφήνεται το σύστημα μεταφοράς DNA για 2 ώρες για να πραγματοποιηθεί η μεταφορά, που οφείλεται σε τριχοειδή φαινόμενα.
- Ξήρανση της μεμβράνης στους 80°C για 2h.

Γ. Προϋβριδοποίηση

- Τοποθέτηση της μεμβράνης στο σωλήνα υβριδοποίησης και προσθήκη 20ml διάλυμα υβριδοποίησης για κάθε 100cm² μεμβράνης (0,2/ cm²) και 100μg/ml SSDNA (salmon sperm, stock 10mg/ml), το οποίο βράζεται για 10min (denaturation) και τοποθετείται στον πάγο για 10min. Διάρκεια προυβριδοποίησης 1.5h.

Δ. Υβριδοποίηση

- Αποδιάταξη του ανιχνευτή θερμαίνοντας στους 95°C - 100 °C για 10min και στην συνέχεια τοποθέτηση στον πάγο για 5min. Αποχύση μέρος του δ/τος υβριδοποίησης έτσι ώστε να παραμείνουν περίπου 2,5ml δ/τος για κάθε 100cm² μεμβράνης. Προσθήκη του αποδιαταγμένου ανιχνευτή και επώαση για 16h στη θερμοκρασία υβριδισμού. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από την ειδικότητα του ανιχνευτή για το συγκεκριμένο δείγμα DNA. Όσο πιο ειδικός είναι τόσο πιο υψηλή είναι και η θερμοκρασία υβριδισμού, ώστε να ευνοούνται μόνο οι ειδικές σύνδεσης.

Ε. Πλύσεις

- Απόχυση του διαλύματος υβριδοποίησης με τον ανιχνευτή σε καθαρό σωλήνα. Το διάλυμα αυτό μπορεί να φυλαχτεί στους -20°C και στη συνέχεια να επαναχρησιμοποιηθεί αφού πρώτα αποδιαταχθεί.
- Ξέπλυμα της μεμβράνης δύο φορές για 5min την κάθε μια σε διάλυμα πλύσης 1 σε θερμοκρασία δωματίου αναδεύοντας ελαφρά. Το διάλυμα αυτό απομακρύνει το μεγαλύτερο του ανιχνευτή που είναι ασθενώς συνδεδεμένος στη μεμβράνη.
- Ξέπλυμα τη μεμβράνη δύο ακόμα φορές για 20min την κάθε μια σε διάλυμα πλύσης 2 στην θερμοκρασία υβριδοποίησης. Το διάλυμα αυτό απομακρύνει τον ανιχνευτή που είναι ισχυρότερα αλλά μη ειδικά συνδεδεμένος.

ΣΤ. Εμφάνιση σήματος

- Εξισορρόπηση της μεμβράνης σε διάλυμα Α για 1min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα Β για τουλάχιστον 30min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απόχυση το διάλυμα Β. Προσθήκη διαλύματος Β, το οποίο περιέχει 5μl συμπλόκου Streptavidin-Alkaline Phosphatase ανά 10ml. Επώαση για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Η στρεπταβιδίνη δεσμεύεται με την βιοτίνη που διαθέτει ο ανιχνευτής που είναι υβριδισμένος.
- Ξέπλυμα της μεμβράνης σε διάλυμα Α, 2 φορές για 15min την κάθε μια.
- Εξισορρόπηση σε διάλυμα C για 2min σε θερμοκρασία δωματίου
- Κάλυψη της μεμβράνης με διάλυμα C, το οποίο περιέχει 50μl NBT (δέκτης ηλεκτρονίων που αντιδρά αυθόρμητα με το O₂ για να δώσει χρώση) και 37.5 μl X-phosphate (BCIP) που είναι το υπόστρωμα της αλκαλικής φωσφατάσης (Alkaline Phosphatase) και περιμένουμε την εμφάνιση χρώματος. Συνήθως αυτό συμπληρώνεται σε λίγα λεπτά της ώρας, αλλά μπορεί να διαρκέσει και περισσότερο από μια ώρα σε περίπτωση που είτε το DNA στο πήκτωμα είτε ο ανιχνευτής είναι σε μικρή ποσότητα. Η εμφάνιση διακόπτεται με πολλαπλά ξεπλύματα σε απιονισμένο H₂O.

2.10 Σήμανση DNA για την δημιουργία ανιχνευτή (probe)

Για να σημειωθεί ένα τμήμα DNA απαιτείται αρχικά η αποδιάταξη του και στην συνέχεια ο πολυμερισμός του με την χρήση της Klenow πολυμεράσης (θραύσμα της DNA πολυμεράσης I) και dNTPs, από τα οποία κάποιο θα είναι σημειωμένο με βιοτίνη ή ακόμα και με ραδιενέργεια. Στο εργαστήριό μας, χρησιμοποιείται το 11-bio-dUTP στη θέση του dTTP στην αντίδραση σήμανσης. Όταν ο probe χρησιμοποιηθεί, η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στην ικανότητα σύνδεσης ανάμεσα στην βιοτίνη και την στρεπταβιδίνη (βλ. Υβριδοποίηση κατά Southern).

Αντιδραστήρια

DNA (500ng/λ)

Ρυθμιστικό διάλυμα Buffer 10x

ddH₂O

Biotin UTP (1mM)

dNTPs (2.5mM each)

Klenow πολυμεράση (5u/μl)

Μεθοδολογία

1. Σε ένα eppendorf τοποθετείται η ποσότητα DNA που απαιτείται και γίνεται προσθήκη buffer (1x) και ddH₂O. Η ποσότητα ddH₂O αντιστοιχεί σε αυτή που απαιτείται για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης (50μl).
2. Βρασμός του δείγματος για 10min και έπειτα τοποθέτηση για 2min στον πάγο. Με το βράσιμο έχει πραγματοποιηθεί αποδιάταξη του DNA ώστε να γίνει στην συνέχεια η διαδικασία του πολυμερισμού.
3. Προσθήκη των dNTPs (0.25mM each), της Biotin UTP (35μM) και τελευταία της Klenow πολυμεράσης (0.1u). Κατά την προετοιμασία της διαδικασίας όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να διατηρούνται στον πάγο.
4. Επώαση του δείγματος στους 37°C overnight.

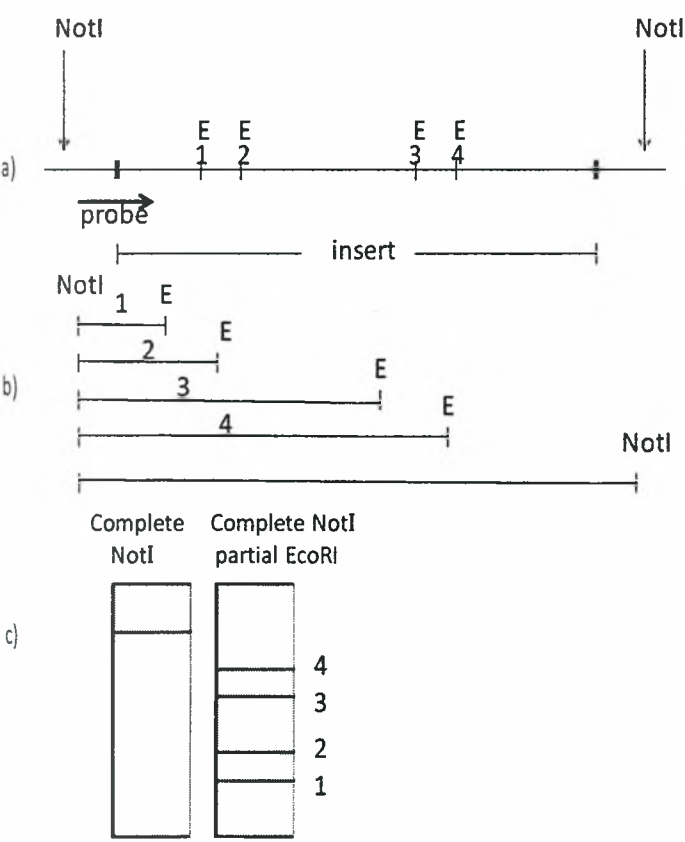
Για την επιβεβαίωση ότι έχει σημειωθεί το τμήμα DNA πραγματοποιείται η διαδικασία του spotting, Σε ένα κομμάτι νάιλον μεμβράνη δημιουργούμε κηλίδες με διάφορες συγκεντρώσεις του ανιχνευτή που σημάνθηκε και έπειτα πραγματοποιείται εμφάνιση του σήματος (βλ. Υβριδοποίηση κατά Southern). Ανάλογα με τον χρόνο και την ένταση εμφάνισης του σήματος επιβεβαιώνεται η επιτυχής διεκπεραίωση της διαδικασίας και επιπρόσθετα παρατηρείται η απόδοση του ανιχνευτή.

2.11 Πρωτόκολλο μερικής πέψης ενζύμων περιορισμού (*partial digestion*)

Το πρωτόκολλο των μερικών πέψεων χρησιμοποιείται στην χαρτογράφηση γενετικού υλικού που έχει κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακό ή φαγικό φορέα με ένζυμα περιορισμού (Mathiopoulos et al, 1995). Όταν πραγματοποιείται χαρτογράφηση ενός

τμήματος DNA με ένζυμο περιορισμού υπάρχουν δύο επιλογές για να εντοπιστούν οι θέσεις κοπής των ενζύμων: α) είτε χρησιμοποιούνται πολλαπλά διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα, ώστε ο συνδυασμός των θραυσμάτων που προκύπτουν (συχνά με τη βοήθεια υβριδοποίησης κατά Southern) να οδηγεί στον εντοπισμό των θέσεων κοπής τους ή β) μπορεί να πραγματοποιηθεί το πρωτόκολλο μερικής πέψης ενζύμων περιορισμού.

Στο πρωτόκολλο αυτό, αρχικά χρησιμοποιείται ένα περιοριστικό ένζυμο που εμφανίζει θέσεις κοπής εκατέρωθεν του ενθέματος και όχι εσωτερικά, με αποτέλεσμα να εξάγεται το ένθεμα από τον φορέα. Έπειτα, γίνεται μια δεύτερη πέψη με ένα ένζυμο που περιέχει πολλαπλές θέσεις κοπής εσωτερικά του ενθέματος. Η πέψη αυτή, σε αντίθεση με την πρώτη, δεν ολοκληρώνεται, είναι δηλαδή μερική (partial digestion). Αυτό επιτυγχάνεται διακόπτοντας τη διαδικασία της πέψης πρόωρα, αφενός χρησιμοποιώντας μικρή ποσότητα ενζύμου αφετέρου προσθέτοντας EDTA σε μικρά κλάσματα κατά τακτά χρονικά διαστήματα και συλλέγοντας τα κλάσματα. Το αποτέλεσμα, εκτός των άλλων, είναι και η δημιουργία θραυσμάτων που από τη μια μεριά έχουν σημείο κοπής το πρώτο ένζυμο και από την άλλη όλες τις πιθανές θέσεις του δευτέρου ενζύμου (Εικ.15-b).



Εικόνα 15. Παράδειγμα μερικής πέψης (partial digestion). α) Το ένθεμα (insert) αποκόπτεται με ολοκληρωμένη πέψη με το ένζυμο NotI (complete NotI). β) Τμήματα DNA που δημιουργούνται κατά τη μερική πέψη με το ένζυμο EcoRI και φέρουν σταθερά άκρα NotI, όπως προέκυψαν από την πρώτη πέψη. γ) Υβριδοποίηση κατά Southern με χρήση ανιχνευτή (probe) που δεσμεύεται στην περιοχή μεταξύ της θέσης κοπής NotI και την αρχή της αλληλουχίας του ενθέματος. Σήμα εμφανίζεται μόνο στα τμήματα της μερικής πέψης που περιγράφηκαν.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται υβριδοποίηση κατά Southern με ανιχνευτή που δεσμεύεται στις πρώτες βάσεις των θραυσμάτων με άκρο το πρώτο ένζυμο (Εικ.15-a). Έτσι, όλα εκείνα τα θραύσματα που από τη μια μεριά έχουν ένα κοινό άκρο (το πρώτο ένζυμο) και την άλλη όλες τις πιθανές θέσεις αναγνώρισης του δευτέρου ενζύμου αναμένεται να εμφανίσουν σήμα με τον συγκεκριμένο ανιχνευτή (Εικ.15-c), δημιουργώντας έναν ακριβή χάρτη των σημείων πέψης του δευτέρου ενζύμου.

Μεθοδολογία

Η περιγραφή της μεθόδου βασίζεται στο παράδειγμα της εικόνας 15.

1. Πέψη 4γDNA ανασυνδυασμένου φορέα με NotI στους 37°C για 2h. Τελικός όγκος αντίδρασης 100μl και απαιτείται προσθήκη BSA.
2. Απενεργοποίηση του ενζύμου: 20min στους 65°C σε υδατόλουτρο
3. Κατακρήμνιση με αιθανόλη
4. Αναδιάλυση στα 30μl H₂O

Σημαίνονται τρία eppendorf και τοποθετούνται οι εξής ποσότητες DNA:

- 5μl (A) (complete NotI πέψη)
- 20μl (B)
- 5μl (Γ)

5. Complete πέψη του Γ με EcoRI, 0.5u. Τελικός όγκος αντίδρασης στα 20μl παρουσία BSA.
6. Partial digestion του B με EcoRI, 1u. Τελικός όγκος αντίδρασης στα 30μl παρουσία BSA.

7. Συλλέγεται ποσότητα (aliquots) από την παραπάνω μερική πέψη στους εξής χρόνους:

5': 13μl + προσθήκη 0.5μl EDTA (B1)

10': 8μl + προσθήκη 0.4μl EDTA (B2)

20': 4μl + προσθήκη 0.3μl EDTA (B3)

30': 3μl + προσθήκη 0.2μl EDTA (B4)

Η προσθήκη του EDTA γίνεται για την απενεργοποίηση του ενζύμου και τον τερματισμό της αντίδρασης.

8. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1% των δειγμάτων A, Γ και του κλάσματος που δημιουργήθηκε με ανάμιξη 2μl καθενός από τα δείγματα B1, B2, B3 και B4.

9. Υβριδοποίηση κατά Southern.

2.12 Απαλοιφή DNA τμημάτων με χρήση Exonuclease III (Generation of unidirectional deletions in DNA fragments)

Η Exonuclease III είναι ένα ένζυμο που έχει δράση 3' > 5' εξωνουκλεάσης σε δίκλωνο DNA, όταν προεκβάλλει το 5'-άκρο ή όταν υπάρχουν τυφλά άκρα, ενώ είναι ανενεργή όταν τουλάχιστον 4 βάσεις προεκβάλλουν στο 3'-άκρο. Αυτή η ικανότητα του ενζύμου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δημιουργηθούν καθορισμένες ελλείψεις σε ένα τμήμα DNA. Τις περισσότερες φορές επιλέγεται όταν δεν υπάρχουν θέσεις κοπής για ένζυμα περιορισμού σε κάποιο τμήμα DNA (Henikoff, 1984). Η Exonuclease III απαλείφει συγκεκριμένο αριθμό βάσεων ανά λεπτό, ανάλογα με την θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η αντίδραση. Η μέθοδος αυτή δίνει τη δυνατότητα να κλωνοποιηθούν τα τμήματα που προκύπτουν με χρήση της S1 νουκλεάσης (S1 nuclease). Το ένζυμο αυτό αποικοδομεί μονόκλωνο DNA απελευθερώνοντας 5'-P μόνο- ή ολιγονουκλεοτίδια. Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται για να την απομάκρυνση των μονόκλωνων τμημάτων που προέκυψαν μετά την απαλοιφή από την Exonuclease III. Έτσι σχηματίζονται τυφλά άκρα στο τμήμα, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η αντίδραση σύνδεσης (ligation) και να είναι εφικτή η κλωνοποίηση του.

Μεθοδολογία

1. Πέψη DNA (10γ) με δύο ένζυμα περιορισμού για τη δημιουργία προεκβάλλοντων 5'- και 3'-άκρων.
2. Εκχύλιση με φαινόλη και χλωροφόρμιο. Αναδιάλυση σε 47μl ddH₂O.
3. Προετοιμασία S1 mix
 - Buffer 32μl (5x)
 - S1 nuclease 100u/μl (0.5μl)
 - ddH₂O 127.5μlΤελικός όγκος 160μl
4. Σήμανση 20 erppendorf και προσθήκη στο καθένα 7.5μl από το S1mix. Διατήρηση στον πάγο.

5. Προετοιμασία αντίδρασης Exonuclease III

- DNA 47μl (βήμα 2)
- Buffer ExoIII 10x 5.0μl (1x)

Προθέρμανση στο υδατόλουτρο στους 30°C

- Exonuclease 200u/μl 1.5μl (300u)

Τελικός όγκος 50μl

6. Επώαση στους 22°C. Ανά 2min συλλέγονται 2.5μl από την αντίδραση και τοποθετούνται στα σημειωμένα eppendorf. Στις συνθήκες αυτές ο ρυθμός απαλοιφής είναι 420bp/2min.

7. Προσθήκη 1μl S1 stop buffer σε κάθε δείγμα (1-20). Επώαση στους 70°C για 10min.

S1 stop buffer

- 0.3M Tris Base Pure
- 0.05M EDTA

8. Ηλεκτροφόρηση 4μl από κάθε δείγμα σε 1% gel αγαρόζης.

9. Δημιουργία κλασμάτων ανά 4 δείγματα (7μl από το καθένα). Κατακρήμνιση με αιθανόλη και αναδιάλυση σε 9μl TE-Buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA). Επώαση των δειγμάτων στους 37°C.

10. Προσθήκη 1μl Klenow mix (20mM Tris-HCl pH8.0, 100mM MgCl₂, 5u Klenow pol) και επώαση στους 37°C για 3min. Η Klenow πολυμεράση χρησιμοποιείται για να συμπληρωθούν μονόκλιωνα άκρα, που πιθανόν δεν απομακρύνθηκαν από την S1 nuclease.

11. Προσθήκη 1μl dNTPs mix 0.5mM και επώαση στους 37°C για 5min.

12. Απενεργοποίηση της Klenow στους 65°C για 10min.

13. Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA με τυφλά άκρα (ligation).

14. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια (transformation)

15. Υγρές καλλιέργειες και απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

2.13 Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης DNA και επεξεργασία αλληλουχίας με το πρόγραμμα Omiga

Ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των κλωνοποιημένων τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Sanger από την εταιρεία MacroGen. Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων αλληλούχησης κάθε δείγματος απαιτούνται 1000ng DNA. Κάθε αλληλουχία που προσδιορίστηκε, επεξεργάστηκε με το πρόγραμμα Omiga. Το Omiga είναι ένα πρόγραμμα επεξεργασίας της πρωτοταγούς δομής του DNA με δυνατότητα σύγκρισης και ομοπαράθεσης αλληλουχιών. Χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση ενθεμάτων από τα επιμέρους τμήματα των αλληλουχιών τους και για την εύρεση θέσεων κοπής περιοριστικών ενζύμων.

Αντιδραστήρια - Διαλύματα

✓ **TBE Buffer 0.5X (1000ml)**

54gr Tris-base

27.5gr βορικό οξύ

20ml EDTA 0.5M

απιονισμένο H₂O

Ρύθμιση pH στο 8.0 με NaOH

✓ **Loading buffer**

0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης

0.25% xylene cyanol FF

15% Ficoll (type 400 Pharmacia)

✓ **Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)**

1gr βρωμιούχο αιθίδιο σε 100ml H₂O

✓ **Membrane Wash solution**

10mM Potassium acetate pH 5.0

80% ethanol

16.7μM EDTA pH 8.0

✓ **Membrane Binding Solution**

4.5M Guinidine isothiocyanate

0.5M Potassium acetate pH 5.0

✓ **LB Broth pH7.2 (1L)**

15gr LB Broth [10 gr/L Tryptone, 5 gr/L εκχύλισμα ζύμης]

10gr NaCl

ddH₂O

Το διάλυμα αποστειρώνεται και σε θερμοκρασία 55°C και προστίθεται το αντιβιοτικό σε αναλογία 100 μl/100ml LB.

✓ **Θρεπτικό μέσο SOB (1L)**

20gr Tryptone

5gr Εκχύλισμα ζύμης

0.5gr NaCl 1M

10ml KCl 250mM

950ml ddH₂O

Ακολουθεί αποστείρωση και στη συνέχεια προσθήκη 5ml MgCl₂ 2M και συμπλήρωση με ddH₂O μέχρι τα 1000ml.

✓ **Διάλυμα FSB (1L)**

10ml Potassium acetate 1 M pH 7.5

8.91gr MnCl₂ x 4H₂O 45mM

1.47gr CaCl₂ 10mM

7.46gr KCl 100mM

0.8gr Hexamminecobalt chloride 3mM

100ml Glycerol 10%.

Για τη συμπλήρωση του τελικού όγκου προσθέτονται 800ml H₂O και το pH ρυθμίζεται στο 6.4.

✓ **SOC υγρό θρεπτικό μέσο**

Όμοια σύσταση με το υγρό θρεπτικό μέσο SOB για τελικό όγκο 1 L, με επιπλέον προσθήκη μετά την αποστείρωση 20 ml γλυκόζης 1M.

✓ **X-gal (20mg/ml)**

Διάλυση X-gal MB=433 σε dimethylformanide

✓ **IPTG (100mM)**

2g IPTG σε 8ml H₂O

✓ **Διάλυμα GET**

50 mM γλυκόζη

25 mM Tris-HCl pH 8.0

10mM EDTA pH 8.0

✓ **Διάλυμα Alkali**

0.2N NaOH

1% SDS

✓ **Διάλυμα SDS 10% (1L)**

100g SDS

ddH₂O

✓ **Διάλυμα CH₃COOK pH 4.8**

60 ml CH₃COOK 5M

11.5ml CH₃COOH

28.5ml ddH₂O

✓ **Διάλυμα TE-RNase (20pg/ml)**

10mM Tris-HCl pH 8.0

1mM EDTA pH 8.0

20μg RNAase

✓ **Διάλυμα CH₃COONa 2.31M pH 5.2 (1L)**

314.2gr CH₃COONa

ddH₂O

✓ **Διάλυμα αποδιάταξης**

1.5M NaCl

0.5M NaOH

✓ **Διάλυμα εξουδετέρωσης**

1.5M NaCl

0.5M Tris-HCl pH 7.5

✓ **Διάλυμα SSC 20x**

3M NaCl

0.3M Na₃ citrate

✓ **Διάλυμα προϋβριδοποίησης**

6x SSC

0.5% SDS

5x Denharts

✓ **Denharts 50x (500ml)**

5gr Ficoll

5gr PVP

5gr bovine serum albumin

ddH₂O

✓ **Διάλυμα SSDNA (10mg/ml)**

0.1g sigma type III sodium salt

ddH₂O

✓ **Διάλυμα υβριδοποίησης**

Διάλυμα προυβριδοποίησης

Ανιχνευτής

✓ **Διάλυμα Πλύσης 1**

2x SSC

0.1% SDS

✓ **Διάλυμα Πλύσης 2**

0.2M SSC

0.1% SDS

✓ **Διάλυμα A**

100mM Tris pH 7.5

150mM NaCl

✓ **Διάλυμα B**

Διάλυμα A

1% Blocking solution (αποβουτηρωμένο γάλα)

✓ **Διάλυμα C**

100mM Tris pH 9.5

100mM NaCl

50mM MgCl₂

✓ **Διάλυμα NBT**

0.5gr σε 10ml 70% dimethyformanid

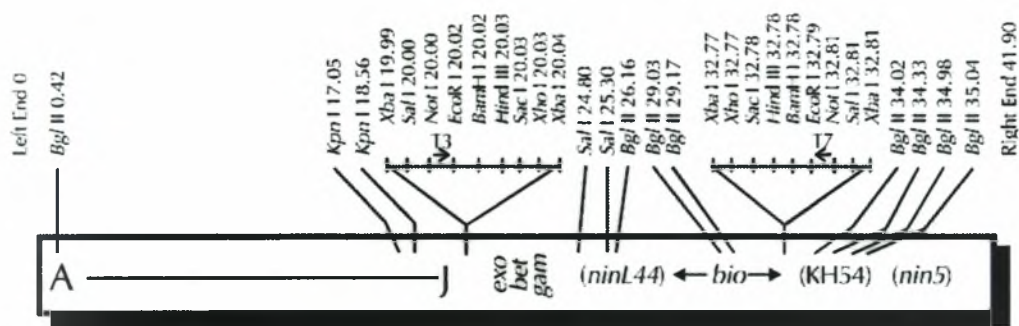
✓ **Διάλυμα BCIP**

0.5gr σε 10ml 100% dimethyformanid

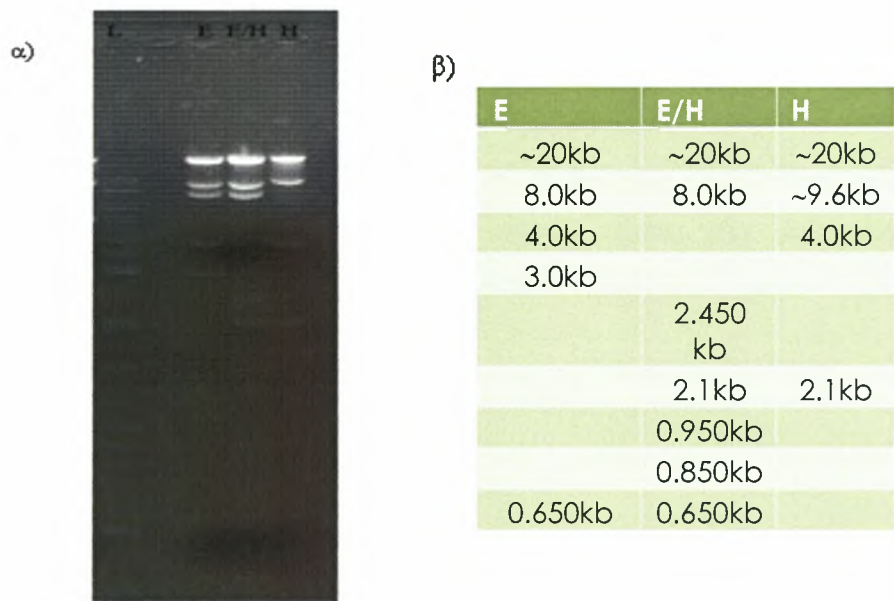
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Χαρτογράφηση με ένζυμα περιορισμού του φάγου 276

Ο φάγος 276 (Φ276) είναι Lambda dash II και το ένθεμα έχει κλωνοποιηθεί στην θέση EcoRI της περιοχής του πολυσυνδέτη του (Εικ.16). Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν τρεις ενζυμικές πέψεις του Φ276 με τα ένζυμα EcoRI, Hind III και τον συνδυασμό τους (EcoRI/Hind III) αντίστοιχα. Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των πέψεων (Εικ.17) παρατηρήθηκε το πρότυπο θέσεων κοπής του ενθέματος (insert), στο οποίο βασίστηκε η διαδικασία της χαρτογράφησης.



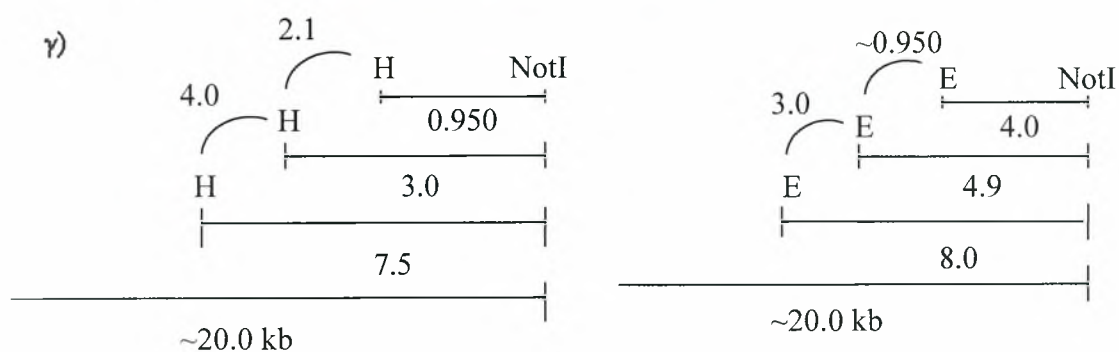
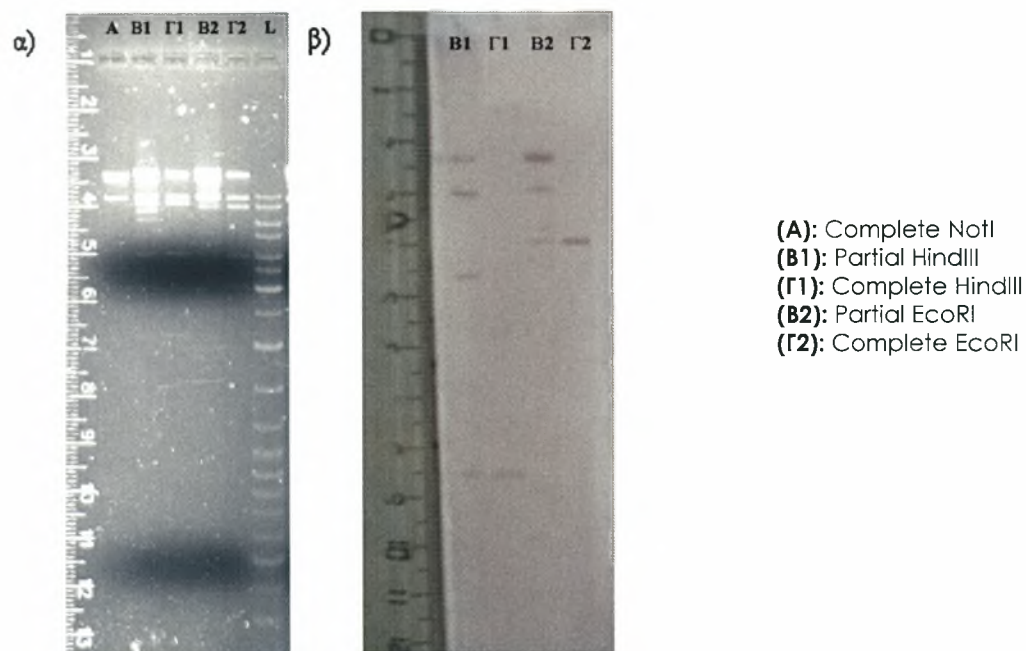
Εικόνα 16. Lambda dash II: Multiple Cloning Site Regions



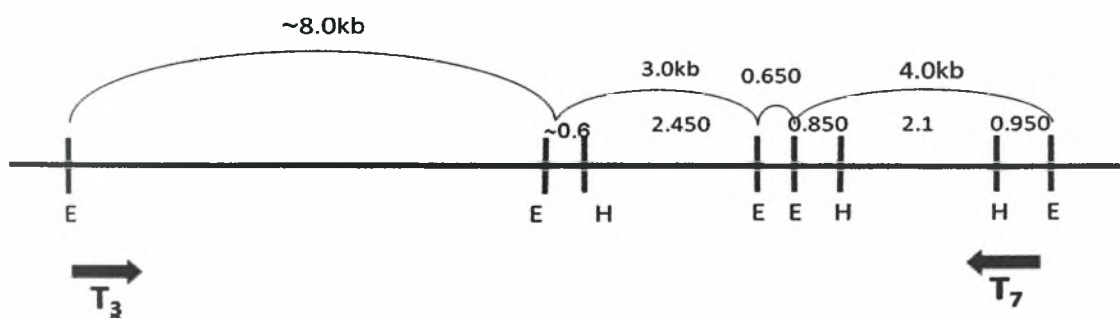
Εικόνα 17. α) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του Φ276 με χρήση των ενζύμων EcoRI, EcoRI/HindIII και HindIII αντίστοιχα. β) Στον πίνακα αναγράφεται το μέγεθος των ζωνών που αντιστοιχούν στα προϊόντα πέψης, σύμφωνα με το πρότυπο του μάρτυρα μοριακού βάρους (L).

Οι ζώνες των ~20kb αντιστοιχούν στους βραχίονες του φάγου. Οι υπόλοιπες παρουσιάζουν τις θέσεις κοπής των ενζύμων του ενθέματος (~15,5kb) που είναι κλωνοποιημένο σ' αυτόν. Κατά την διπλή πέψη με τον συνδυασμό των ενζύμων EcoRI και HindIII, οι ζώνες που δεν αντιστοιχούν σε εκείνες των μοναδικών πέψεων προκύπτουν λόγω ύπαρξης θέσης/-ων κοπής εσωτερικά του ενός από τα δύο ένζυμα. Για παράδειγμα, η ζώνη των 4kb από την πέψη με EcoRI, στην διπλή πέψη δεν εμφανίζεται λόγω των εσωτερικών θέσεων κοπής του HindIII, οπότε δημιουργούνται μικρότερου μεγέθους ζώνες. Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων των πέψεων σχηματίστηκαν διάφοροι πιθανοί χάρτες, στους οποίους καθορίζονται οι θέσεις κοπής των ενζύμων ανάλογα με τους συνδυασμούς που μπορούν να δημιουργηθούν. Με αυτή την διαδικασία, δεν είναι δυνατό να καθοριστεί η ακριβής θέση όλων των σημείων κοπής. Γι' αυτό και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της μερικής πέψης με ένζυμα περιορισμού (βλ.2.11).

Αρχικά έγινε πέψη με το ένζυμο NotI που εμφανίζει θέσεις κοπής εκατέρωθεν του ενθέματος. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μερικές πέψεις με τα ένζυμα EcoRI και HindIII. Η υβριδοποίηση κατά Southern έγινε με dUTP-bio σημασμένο T7 RNA ανιχνευτή στους 60°C. Ο ανιχνευτής αυτός σχεδιάστηκε να δεσμεύεται στην περιοχή μεταξύ της θέσης του T7 προαγωγέα που διαθέτει ο φάγος (Εικ.16) και της πρώτης θέσης κοπής του ενθέματος από το ένζυμο HaeIII. Σήμα έδωσαν όλα τα τμήματα που δημιουργήθηκαν από τις μερικές πέψεις με τα ένζυμα EcoRI και HindIII αντίστοιχα και φέρουν σταθερά άκρα NotI. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των σημάτων της υβριδοποίησης (Εικ.18) σχεδιάστηκε η σειρά των τμημάτων του ενθέματος, όπως αυτά είναι κλωνοποιημένα στον Φ276 (Εικ.18-γ). Αυτά τα στοιχεία σε συνδυασμό με τους πιθανούς χάρτες που σχηματίζονταν με τις αρχικές πέψεις, μας βοήθησαν στον σχεδιασμό του χάρτη περιοριστικών ενζύμων του Φ276 (Εικ19).



Εικόνα 18. α) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης για την πραγματοποίηση της μεταφοράς του DNA σε νάιλον μεμβράνη. β) Εμφάνιση των σημάτων μετά την υβριδοποίηση με τον ανιχνευτή T7 RNA. γ) Επεξεργασία σημάτων.

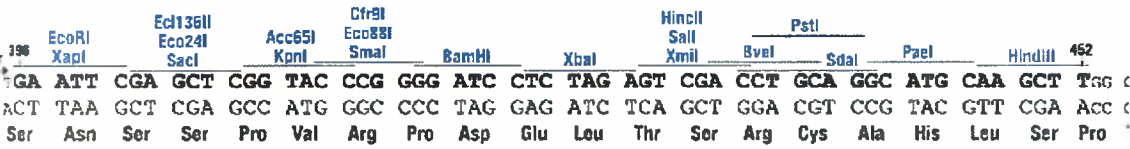


Εικόνα 19. Χάρτης περιοριστικών ενζύμων φάγου 276.

3.2 Κλωνοποίηση 276/1 (8.0kb EcoRI)

Για την πλήρη αλληλούχηση του Φ276 πρέπει να κλωνοποιηθούν όλα τα θραύσματα του ενθέματος που προκύπτουν από τις παραπάνω πέψεις. Κάποια από αυτά έχουν μεγάλο μέγεθος που καθιστά μη εφικτή τον πλήρη καθορισμό της πρωτοταγούς δομής τους. Αυτά τα τμήματα πρέπει να υποκλωνοποιηθούν. Ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στο τμήμα των 8.0kb EcoRI, που ονομάστηκε 276/1, με το οποίο ξεκίνησε η διαδικασία των υπο-κλωνοποιήσεων.

Πραγματοποιώντας αρχικά πέψη του Φ276 με το ένζυμο EcoRI. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν και με το πρωτόκολλο της εταιρείας Promega (βλ.2.4) ανακτήθηκε το τμήμα 276/1 από το gel. Έπειτα, ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης με φορέα pUC19 (Εικ.20) που διαθέτει συμβατά άκρα με το ένθεμα και μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με το ανασυνδυασμένο αυτό πλασμιδίο. Αναπτύχθηκαν υγρές καλλιέργειες και έγινε απομόνωση πλασμιδιακού DNA όπου πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο EcoRI για την επιβεβαίωση της κλωνοποίησης του 276/1.

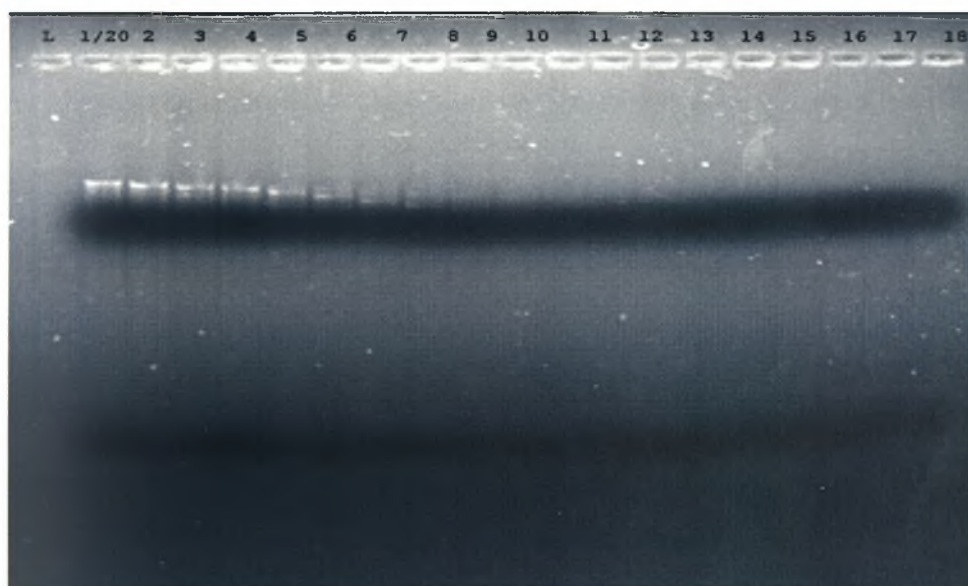


Εικόνα 20. Θέσεις περιοριστικών ενζύμων στον πολυσυνδέτη του φορέα pUC19. Το τμήμα 276/1 κλωνοποιήθηκε στην θέση EcoRI του φορέα pUC19.

3.3 Υποκλωνοποίηση 276/1 (8.0kb EcoRI)

Όπως αναφέρθηκε το τμήμα 276/1 του ενθέματος έχει μεγάλο μέγεθος που καθιστά αδύνατη την πλήρη αλληλούχηση του γι' αυτό πραγματοποιήθηκε υποκλωνοποίησή του. Δοκιμάστηκε μια σειρά ενζύμων (Taq, AluI, HalIII, AfaI, HpaII, DpnII, MnlI, HhaI, MboI) και διαπιστώθηκε ότι η πλειοψηφία αυτών δεν έπεπταν καθόλου το τμήμα 276/1. Κάποια από τα ένζυμα αυτά, όπως το AluI, έπεπταν το 276/1 αλλά προέκυπταν πολλαπλά τμήματα μικρού μεγέθους που καθιστούσαν την υποκλωνοποίησή τους μη εφικτή. Εναλλακτικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος

απαλοιφής τμημάτων DNA με χρήση της Exonuclease III (generation of unidirectional deletions in DNA fragments) (βλ.2.12). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη του φορέα που περιέχει το ένθεμα με τα ένζυμα BamHI και PstI. Τα 5'- και 3'-προεκβάλλοντα άκρα που δημιουργούνται αντίστοιχα εξασφαλίζουν τη δράση της Exonuclease III (Εικ.20). Τα τμήματα DNA που σχηματίστηκαν με την δράση της Exonuclease III ηλεκτροφορήθηκαν (Εικ.21). Παρατηρείται ότι το ένθεμα των 8.0kb μειώνεται κάθε φορά κατά ~420bp.

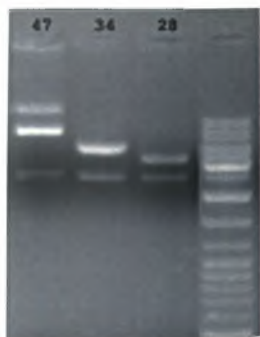


Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων (1-20) μετά την δράση της Exonuclease III. Παρατηρείται ότι το αρχικό ένθεμα των 8.0kb μειώνεται κάθε φορά κατά ~420bp. Στη θέση L είναι ο μάρτυρας μοριακού βάρους.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε pool (ανάμιξη) των δειγμάτων 6 (8.0kb), 7 (7.7 kb), 8 (7.5kb) και 9 (7.2kb) και επανακυκλοποίηση τους με αντίδραση σύνδεσης. Τέλος, βακτηριακά κύτταρα μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδια αυτά. Αναπτύχθηκαν υγρές καλλιέργειες και έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Προς επιβεβαίωση της κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε πέψη με το ένζυμο PvuII, του οποίου οι θέσεις κοπής δεν έχουν επηρεαστεί από την δράση της Exonuclease III, που αναμένεται στην ηλεκτροφόρηση να δώσει την ζώνη του φορέα (~2.7kb) και τη ζώνη του ενθέματος.

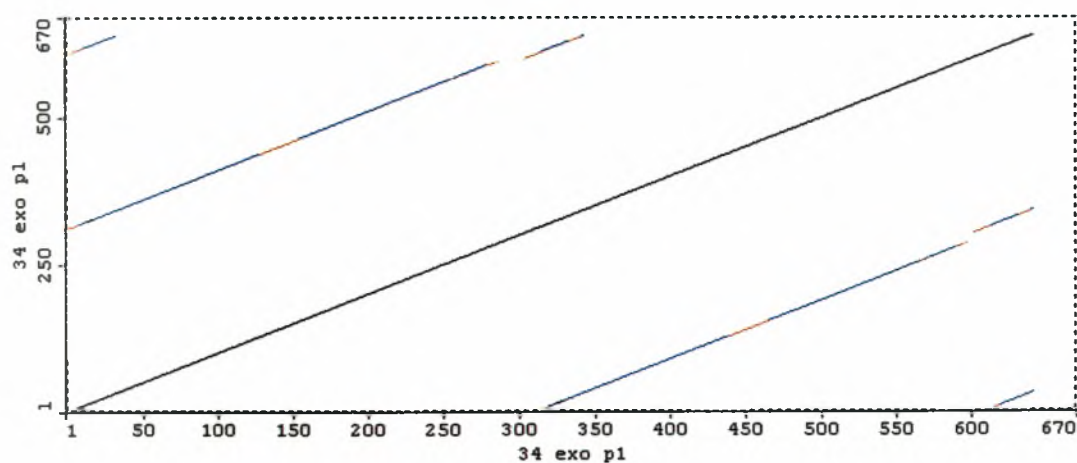
Τα δείγματα 28, 34, και 47 επιβεβαιώθηκαν (Εικ.22), τα οποία αντιστοιχούν σε 3 από τα 4 δείγματα του pool.



Εικόνα 22. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης των δειγμάτων 28, 34 και 47 με το ένζυμο PvuII. Στις 2.7kb παρατηρείται η ζώνη του φορέα pUC19 που εμφανίζεται και στα τρία δείγματα. Τα ενθέματα παρατηρούνται στις 5.5kb, 4.5kb και 3.5kb αντίστοιχα.

3.4 Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης δειγμάτων 28, 34, 47 και επεξεργασία με Omiga

Τα δείγματα 28, 34, και 47 στάλθηκαν στην εταιρεία Macrogen για τον καθορισμό της DNA αλληλουχίας τους. Το δείγμα 47 δεν αλληλουχήθηκε επιτυχώς. Τα αποτελέσματα από την επιτυχή αλληλούχηση των δειγμάτων 28 και 34 επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Omiga. Η ανάλυση της αλληλουχίας του κλώνου 34 (670bp) μέσω Dot-plot έδειξε ότι το δείγμα περιέχει μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 300bp που επαναλαμβάνεται ~2.5 φορές (Εικ.23). Το ίδιο αποτέλεσμα έδειξε και η αντίστοιχη ανάλυση της αλληλουχίας του κλώνου 28 (490bp). Η επανάληψη αυτή ονομάστηκε BoR300.



Εικόνα 23. DOT PLOT της αλληλουχίας του δείγματος 34.

Στο δείγμα 28 βρέθηκε ολόκληρη η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία από την θέση 25 μέχρι την 325 και ένα δεύτερο τμήματα της από την 336-490. Παρόμοια, στο δείγμα 34 όπως παρατηρείται από το Dot Plot (Εικ.23), το BoR300 βρέθηκε ολόκληρο στην 9-320 και στην 321-615, και ένα μικρότερο τμήματα του στην 616-670.

3.5 Κλωνοποίηση *BoR300*

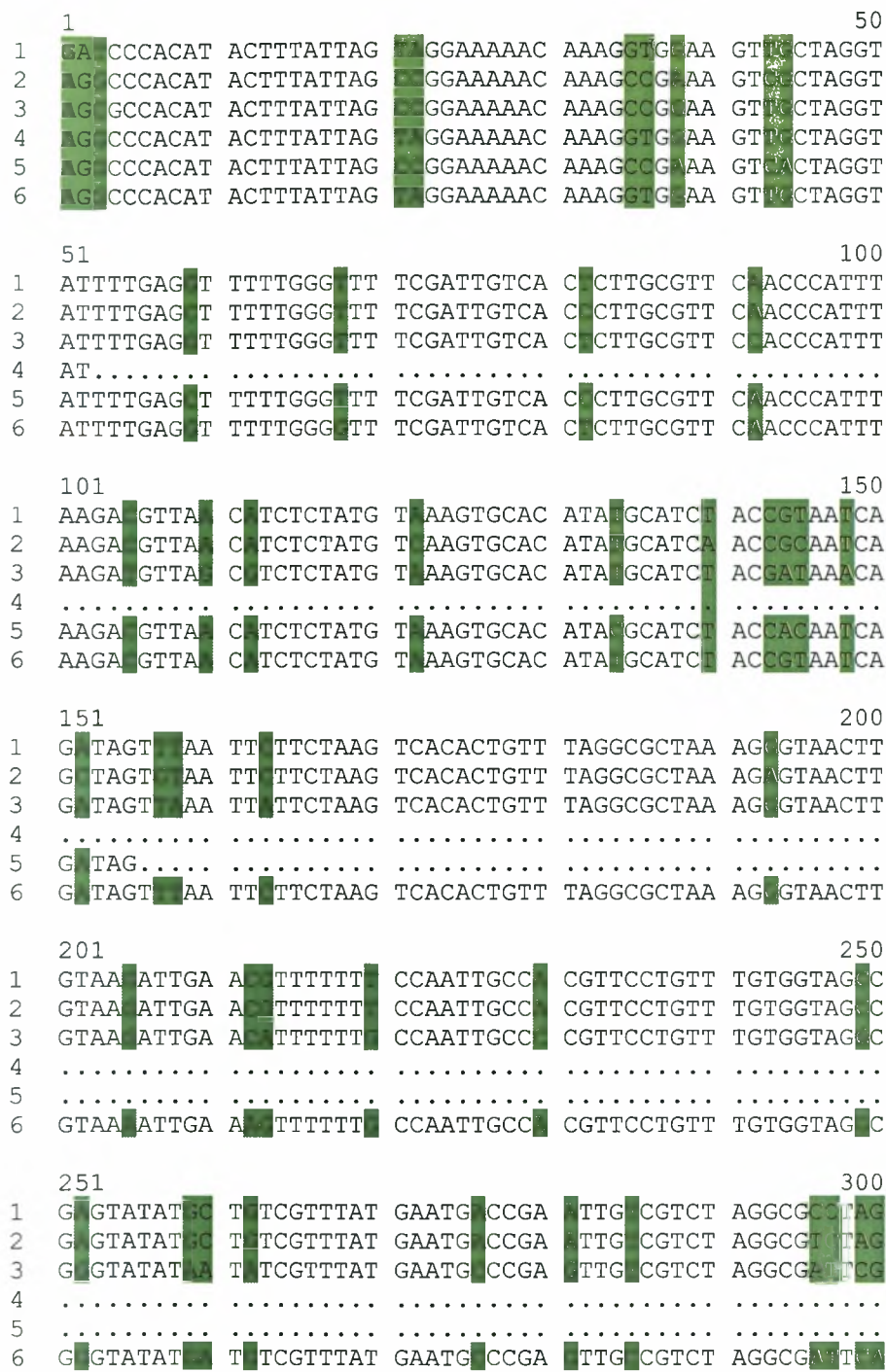
Για την κλωνοποίηση του BoR300 χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 34 όπου έχει πραγματοποιηθεί επιτυχής αλληλούχηση για μεγαλύτερο τμήμα (670bp) απ' ότι για το δείγμα 28 (420bp). Με επεξεργασία με το πρόγραμμα Omiga βρέθηκαν οι θέσεις κοπής του BoR300 από περιοριστικά ένζυμα. Το HaeIII αναγνωρίζει την θέση 4 του επαναλαμβανόμενου τμήματος (Εικ.24), με αποτέλεσμα να εξάγεται ολόκληρο το BoR300 από το δείγμα 34 και να είναι δυνατή η κλωνοποίηση του.



Εικόνα 24. Θέσεις περιοριστικών ενζύμων στο BoR300.

Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, πέψη του δείγματος 34 με το ένζυμο HaeIII, το οποίο δημιουργεί τυφλά άκρα και στην συνέχεια απομόνωση του τμήματος BoR300 από το gel ηλεκτροφορήσης με το πρωτόκολλο της εταιρείας Promega (βλ.2.4). Ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης με φορέα EcoRV, ο οποίος διαθέτει τυφλά άκρα. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων (transformation) και αναπτύχθηκαν υγρές καλλιέργειες. Με την διαδικασία απομόνωσης πλασμιδιακού DNA, πραγματοποιώντας πέψη με το ένζυμο HaeIII επιβεβαιώθηκε η κλωνοποίηση του BoR300. Στάλθηκε στην εταιρεία Macrogen για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής του.

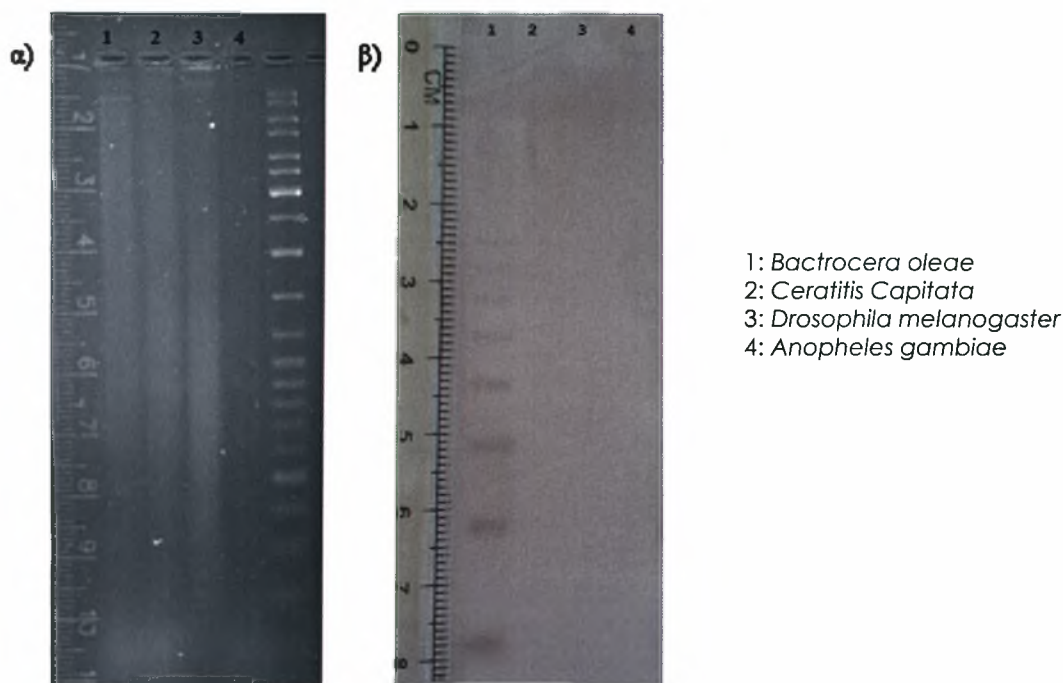
3.6 Στοιχισή των αλληλουχιών του BoR300



Εικόνα 25. Στοιχισή των αλληλουχιών του BoR300, από τις επαναλήψεις του στα δείγματα 34, 28 και από την αλληλούχησή μετά την κλωνοποίησή του (3.5). Η σειρά των αλληλουχιών είναι: 1. BoR300 (πλασμίδιο), 2. Δείγμα 28 (25-325), 3. Δείγμα 28 (336-490), 4. Δείγμα 34(321-615), 5. Δείγμα 34 (616-670), 6. Δείγμα 34 (9-320). Τα χρωματισμένα τμήματα δείχνουν τα σημεία που υπάρχει αλλαγή βάσης.

3.7 Υβριδοποίηση κατά Southern γενωμικού DNA εντόμων με ανιχνευτή το BoR300

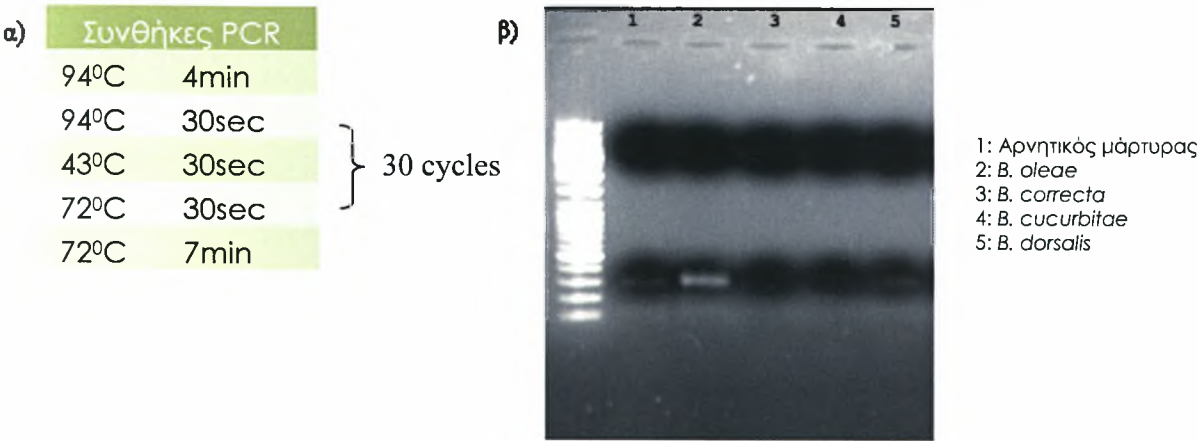
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σήμανση του BoR300 με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην ενότητα 2.10. Η υβριδοποίηση του ανιχνευτή BoR300 έγινε με γενωμικό DNA από τα εξής έντομα της τάξης των διπτέρων: *Bactrocera oleae*, *Ceratitis Capitata*, *Drosophila melanogaster* και *Anopheles gambiae* (το γενωμικό των εντόμων ήταν διαθέσιμο στο εργαστήριο). Πραγματοποιήθηκε πέψη του γενωμικού DNA με το περιοριστικό ένζυμο HaeIII, το οποίο αναγνωρίζει 4 βάσεις με αποτέλεσμα να πέπτει το γενωμικό DNA σε πολλά τμήματα μέσου μεγέθους ~250 bp. Μετά πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση (Εικ.26) με ανιχνευτή το BoR300. Ζώνη υβριδοποίησης εμφανίστηκε μόνο στο γενωμικό DNA του *Bactrocera oleae*. Συγκεκριμένα, στην μεμβράνη εμφανίστηκε μία ‘σκάλα’ πολλαπλασιών των 300bp. Αυτό είναι απόρροια του πολυμορφισμού των θέσεων κοπής του HaeIII στα άκρα του BoR300.



Εικόνα 26. α) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του γενωμικού DNA των εντόμων με το ένζυμο HaeIII. Λόγω του μεγέθους του γενωμικού DNA και των πολλαπλών θέσεων αναγνωρίσεις από το HaeIII, τα προϊόντα εμφανίζονται ως smear. β) Η εμφάνιση της υβριδοποίησης του γενωμικού DNA των εντόμων με ανιχνευτή το BoR300.

3.8 PCR με BoR300 primers

Με την βοήθεια του προγράμματος Omiga σχεδιάστηκαν εκκινητές στα άκρα του BoR300 για την ειδική ενίσχυση της επανάληψης αυτής. Πραγματοποιήθηκε PCR σε γενωμικό DNA 4 ατόμων του γένους *Bactrocera*, για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή μη του επαναλαμβανόμενου τμήματος. Τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν *B. oleae*, *B. correcta*, *B. cucurbitae* και *B. dorsalis*. Οι συνθήκες της PCR και τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 27.

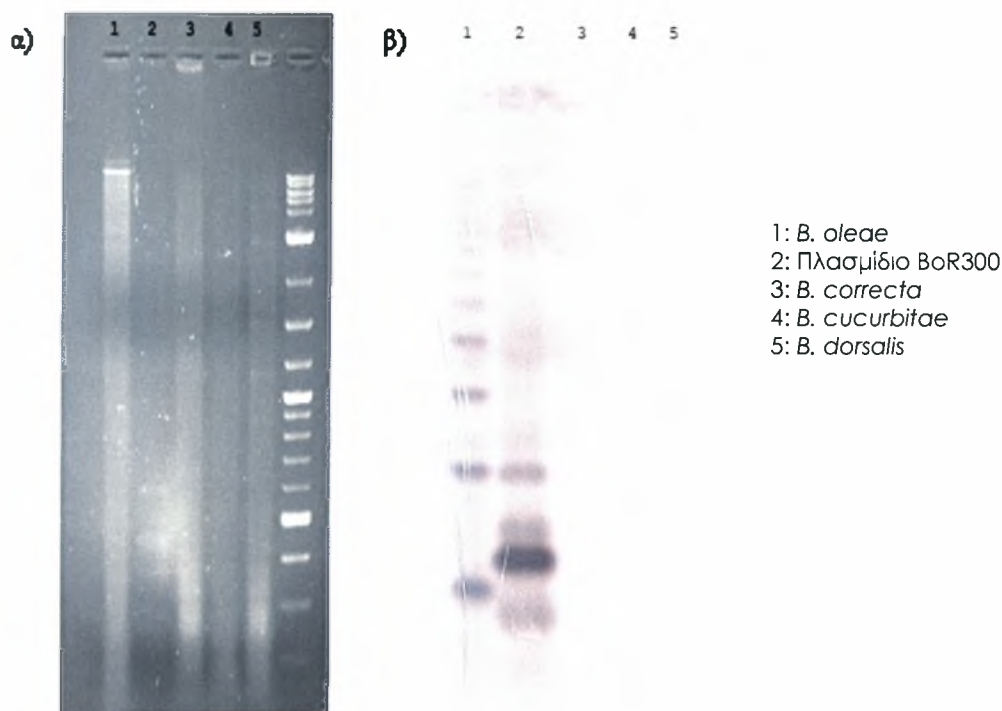


Εικόνα 27. α) Συνθήκες πραγματοποίησης της PCR. β) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR.

Από το gel ηλεκτροφόρησης παρατηρείται ενίσχυση του BoR300 στο *B. oleae* και σε μικρότερο ποσοστό στο *B. dorsalis*. Ωστόσο, το αποτέλεσμα στη περίπτωση του *B. dorsalis* μπορεί να είναι ψευδώς θετικό, αποτέλεσμα ενίσχυσης πιθανής μόλυνσης (όπως και εκείνο του αρνητικού μάρτυρα). Για την επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής, πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση κατά Southern γενωμικού DNA των εντόμων αυτών μετά από πέψη με κατάλληλο ένζυμο περιορισμού και με ανιχνευτή το BoR300.

3.9 Υβριδοποίηση κατά Southern γενωμικού DNA ατόμων του γένους *Bactrocera* με ανιχνευτή το BoR300

Χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA από τα άτομα του γένους *Bactrocera* που αναφέρονται στην ενότητα 3.7, στα οποία έγινε πέψη με HaeIII. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που περιέχει το BoR300. Έπειτα, ακολούθησε η υβριδοποίηση με ανιχνευτή το BoR300.



Εικόνα 28. α) Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του γενωμικού DNA των ατόμων *Bactrocera* με το ένζυμο HaeIII. Λόγω του μεγέθους του γενωμικού DNA και των πολλαπλών θέσεων αναγνώρισης από το HaeIII, τα προϊόντα εμφανίζονται ως smear. β) Η εμφάνιση της υβριδοποίησης του γενωμικού DNA με ανιχνευτή το BoR300.

Παρατηρήθηκε εμφάνιση σήματος στο *B. oleae* και στο πλασμίδιο του BOR300. Αντίθετα, δεν ανιχνεύτηκε σήμα υβριδοποίησης στο *B. dorsalis*. Η ευαισθησία της υβριδοποίησης κατά Southern αντικατοπτρίζει καλύτερα την πραγματικότητα και το γεγονός της μη ανίχνευσης σήματος στο *B. dorsalis* συνηγορεί στην ύπαρξη μόλυνσης κατά την PCR.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εργασία αυτή είναι μέρος της μελέτης ανάλυσης της μοριακής οργάνωσης του Υ χρωμοσώματος του *Bactrocera oleae* που διεκπεραιώνεται στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας. Σε προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν απομονώθηκε ένα τμήμα DNA 1.2kb, το οποίο αποτελεί μέρος ενός ρετρομεταθετού στοιχείου με προτίμηση στο Υ χρωμόσωμα. Το στοιχείο αυτό ονομάστηκε *Achilles*. Τα μεταθετά στοιχεία που έχουν χαρακτηριστεί στην τάξη των δίπτερων έχει φανεί να εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η υβριδική δυσγένεση, η οριζόντια μεταφορά, το εναλλακτικό μάτισμα γονιδίων, η χρωμοσωμική αναδιάταξη, η τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση, η δημιουργία ετεροχρωματίνης ακόμα και στη δομή μιας νέας μορφής τελομερών (Kidwell MG., 2005). Επιπρόσθετα, ορισμένα από αυτά εντοπίζονται σε ετεροχρωματινικές περιοχές χρωμοσωμάτων και ιδιαίτερα στο Υ χρωμόσωμα, που έχει προταθεί είτε ως η πηγή των ρετρομεταθετών στοιχείων, είτε ως η περιοχή συσσώρευσής τους (Rohr et al., 2002). Λόγω της σημαντικότητας της λειτουργίας των μεταθετών στοιχείων, της δυνατότητας χρησιμοποίησής τους ως φορέων γενετικού μετασχηματισμού, αλλά και διότι το συγκεκριμένο μεταθετό εμφανίζει προτίμηση στο Υ χρωμόσωμα, θεωρήθηκε αναγκαία η προσπάθεια απομόνωσης ολόκληρης της αλληλουχίας του ρετρομεταθετού και ο χαρακτηρισμός του.

Μετά από σύγκριση της διαθέσιμης αλληλουχίας του *Achilles* στη βάση δεδομένων (Blast search) φάνηκε να περιέχει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης με μεγάλης ομοιότητας στις τρανσποζάσες gag των ρετρομεταθετών στοιχείων της οικογένειας BEL-Pao αλλά και ένα ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο ανοδικά της gag με χαρακτηριστικές περιοχές δακτύλων ψευδαργύρου. Προφανώς το ρετρομεταθετό στοιχείο που αντιπροσωπεύεται από το *Achilles*, ανήκει στα ρετρομεταθετά της οικογένειας BEL-Pao, τα οποία εμφανίζονται σε πολλά διάφορα φύλα, γεγονός που είναι αποτέλεσμα οριζόντιας μεταβίβασης (Marsano et al., 2003). Στην *Drosophila melanogaster* έχει χαρακτηριστεί ένα τέτοιο στοιχείο, το ρετρομεταθετό MAX που εντοπίζεται στις ετεροχρωματινικές περιοχές των αυτοσωμάτων και είναι διάσπαρτο στο Υ χρωμόσωμα (Marsano et al., 2003). Μετά από *in situ* υβριδοποίηση του *Achilles* σε μιτωτικά χρωμοσώματα του δάκου διαπιστώθηκε ότι και αυτό εντοπίζεται σε ετεροχρωματινικές περιοχές των χρωμοσωμάτων, συμπεριλαμβανομένου και του Υ.

Για την απομόνωση ολόκληρου του ρετρομεταθετού στοιχείου σχεδιάστηκαν

εκκινητές που ενισχύουν το αρχικό τμήμα των 1.2kb και με αυτούς πραγματοποιήθηκε PCR σε κλάσματα φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου. Στη συνέχεια, έγινε διαλογή των κλασμάτων που έδωσαν προϊόν ενίσχυσης υβριδοποιώντας τα με ανιχνευτή το τμήμα των 1.2kb. Ένας από τους φάγους που απομονώθηκε ήταν ο Φ276. Για επιβεβαίωση πραγματοποιήθηκε υβριδοποίηση κατά Southern του Φ276 μετά από πέψη με EcoRI, HindIII και το συνδυασμό τους και με ανιχνευτή το τμήμα των 1.2kb, όπου έδωσε σήμα μόνο το τμήμα EcoRI των 8kb (276/1) που περιέχεται σ' αυτόν. Για τον λόγο αυτό το τμήμα αυτό κλωνοποιήθηκε και επεξεργάστηκε εκτενώς. Ήταν πιθανό ολόκληρο το ρετρομεταθετό στοιχείο να βρίσκεται στο τμήμα αυτό.

Είναι σημαντικό να απομονωθεί το ρετρομεταθετό στοιχείο ώστε να αποκαλυφθεί η δομή του, η οποία πιθανό να είναι συντηρημένη σε όλα τα στοιχεία αυτής της οικογένειας. Επιπρόσθετα, είναι σημαντικό να απομονωθούν γειτονικές περιοχές του *Achilles* και συγκεκριμένα μοναδικά τμήματα DNA. Αφού το ρετρομεταθετό έχει προτίμηση στο Y χρωμόσωμα πιθανόν τα τμήματα αυτά που θα απομονωθούν να είναι περιοχές του Y. Αυτές οι μοναδικές περιοχές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως Y ειδικοί ανιχνευτές. Ένας τρόπος χρησιμοποίησής τους είναι για την βελτιστοποίηση της τεχνικής δακοπροστασίας S.I.T (Sterile Insept Technique) (βλ.1.1.6).

Παράλληλα, με την ανάλυση της αλληλουχίας του 276/1, όμως, αποκαλύφθηκε η ύπαρξη μιας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας 300bp. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας η επανάληψη αυτή, που ονομάστηκε BoR300, είναι ειδική για το *Bactrocera oleae*. Μετά από την πραγματοποίηση στοίχισης όλων των αλληλουχιών που βρέθηκαν στα δείγματα που επεξεργάστηκαν (βλ.3.5) φάνηκε ότι η αλληλουχία του BoR300 είναι συντηρημένη κατά 91%. Συγκεκριμένα, οι επαναλήψεις του BoR300 που βρέθηκαν στην αλληλουχία του δείγματος 34 μετά από στοίχιση τους υπολογίστηκε ότι είναι συντηρημένες κατά 94%. Το ίδιο αποτέλεσμα εξάχθηκε και για τις επαναλήψεις του δείγματος 28. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι πιθανόν οι επαναλήψεις του BoR300 στα δείγματα αυτά εντοπίζονται στο ίδιο χρωμόσωμα του *Bactrocera oleae* (Stratikopoulos et al., 2002).

Γνωρίζουμε ότι το επαναλαμβανόμενο DNA ή δορυφορικό εντοπίζεται συνήθως σε ετεροχρωματικές περιοχές όπως τα κεντρομερή, τα χρωμόκεντρα και τα τελομερή (Genes VIII). Η λειτουργία του φαίνεται πως σχετίζεται με την οργάνωση της δομής των χρωμοσωμάτων, τη σύναψη των ομολόγων χρωματοσωμάτων στη μείωση και τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων (Genomes).

Στο έντομο *Ceratitis capitata* που ανήκει στην τάξη των δίπτερων βρέθηκε μία περικεντρική επανάληψη 44bp που δεν εμφανίζεται σε κανένα άλλο συγγενικό είδος (Stratikopoulos et al, 2002). Εντοπίζεται σε τέσσερα από τα πέντε χρωμοσώματα και το X χρωμόσωμα και αποτελεί το 0.24% του γονιδιώματος του εντόμου. Οι επαναλήψεις του στοιχείου αυτού στο γονιδίωμα του *Ceratitis capitata* είναι ιδιαίτερα συντηρημένες. Σε μελέτες κεντρομερών άλλων εντόμων όπως της *Drosophila* φάνηκε ότι τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία που βρίσκονται στο κεντρομερές των χρωμοσωμάτων είναι συντηρημένα σε σύγκριση με τα ευκαρυωτικά (Sun et al., 1997).

Λαμβάνοντας υπόψη τις μελέτες επαναλαμβανόμενων στοιχείων σε άλλα έντομα όπως αυτή στο *Ceratitis capitata*, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί *in situ* υβριδοποίηση του BoR300 σε πολυταινικά και μιτωτικά χρωμοσώματα του δάκου. Με αυτή την διαδικασία θα εντοπιστούν οι ακριβείς θέσεις του στοιχείου στα χρωμοσώματα του εντόμου. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να υπολογιστεί ο αριθμός των επαναλήψεων του στο γονιδίωμα του δάκου ώστε να χαρακτηριστεί η συμμετοχή του στη δομή του γονιδιώματος.

Το γεγονός ότι το BoR300 είναι ειδικό για το *Bactrocera oleae* το καθιστά έναν ανιχνευτή είδους. Με έναν τέτοιο ανιχνευτή είναι δυνατό να χαρακτηριστούν άτομα του δάκου που διαχειμάζουν το έδαφος στο στάδιο της προνύμφης (larva) ή της νύμφης (pupa). Σε αυτό το στάδιο του βιολογικού κύκλου του εντόμου είναι δύσκολο να διαχωριστεί από άλλα συγγενικά έντομα. Έχοντας υπόψη την οικονομική σημασία του δάκου, ένα τέτοιο διαγνωστικό εργαλείο θα φανεί ιδιαίτερα χρήσιμο στην αναγνώριση του εντόμου.

5. Βιβλιογραφία

- Arambourg, Y., 1966. Appliquee a l'agriculture, In A.S. Balachowsky ed. Entomologie Paris II-1, Masson. pp.181-193.
- Augustinos AA, Mamuris Z, Stratikopoulos EE, D'Amelio S, Zacharopoulou A and Mathiopoulos KD. (2005) Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica*, 125:231- 241.
- Benet A, Molla G, Azorin F: d(GA X TC)(n) microsatellite DNA sequences enhance homologous DNA recombination in SV40 minichromosomes. *Nucleic Acids Res* 2000, 28(23):4617-22.
- Benos P., N. Tavernarakis, S. Brogna, G. Thireos, C. Savakis, (2000). "Acquisition of a potential marker for insect transformation: isolation of a novel alcohol dehydrogenase gene from *Bactrocera oleae* by functional complementation in yeast", *Mol. Gen. Genet.* 263:90-95.
- Γαμβριάς Χ., 1994. Γεωργική Εντομολογία, τεύχος 2ο: Εντομολογικοί εχθροί ελιάς.
- Deininger PL, Batzer MA. Mammalian retroelements. *Genome Research*. 2002;12(10):1455–1465.
- Economopoulos, A.P., Giannakakis, A., Tzanakakis, M.E. and Voyadjoglou, A.V. 1971. "Reproductive behavior and physiology of the olive fruit fly. Anatomy of the adult rectum and odors emitted by adults". *Ann. Entomol. Soc. Am.* 64.
- Economopoulos AP. 1979. Attraction of *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera, Tephritidae) to odor and color traps. *Zeitschrift fur Angewandte Entomologie* 88:90–7.
- Economopoulos A.P.(1972). Sexual competitiveness of g-ray sterilized males of *Dacus oleae*. Mating frequency of artificially reared and wild females. *Environment Entomology* 1:490-497.
- Economopoulos AP. 2002. The olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae): Its importance and control; previous SIT research and pilot testing. Report to International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna, Austria. 44 p.
- Ericka R Havecker, Xiang Gao and Daniel F Voytas, 2004. The diversity of LTR retrotransposons, *Genome Biology*, 5:225.
- Feschotte C, Zhang X, Wessler S. Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements and their Relationship to Established DNA Transposons, 2002. Washington DC: ASM Press. 1147-1158.
- Fletcher BS, Pappas S, Kapatos E. 1978. Changes in the ovaries of olive flies (*Dacus oleae* [Gmelin]) during the summer, and their relationship to temperature, humidity and fruit availability. *Ecol Entomol* 3:99–107.

- Frizzi, G. & A. Springetti, 1953. Prime ricerche citogenetiche sul “*Dacus oleae* Gmel”. Ric. Sci. 23: 1613–1620.
- Genes VIII, Lewin Benjamin, Ακαδημαϊκές εκδόσεις, 2004.
- Genes IX, Lewin Benjamin, Jones and Bartlett, International edition, 2008.
- Genomes, T.A Brown, Department of biomolecular sciences, UMIST, Manchester, 2nd edition, BIOS, 2002.
- Henikoff S., 1984. Unidirectional digestion with ExonucleaseIII creates targeted breakpoints for DNA sequencing, Gene, 28, 351-359.
- Holyoake AJ, Kidwell MG. Vege and Mar, 2003. Two novel hAT MITE families from *Drosophila willistoni*. Molecular Biology and Evolution, 20(2):163-167.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., and Thein, S.L. 1985. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. Nature 316: 76-79.
- Joseph Sambrook and David W. Russel (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction.
- Kapatos ET, Fletcher BS. 1984. The phenology of olive fly, *Dacus oleae* Gmel. (Diptera, Tephritidae), in Corfu. Zeitschrift fur Angewandte Entomologie 97:360–70.
- Kennedy, G.C., German, M.S., and Rutter, W.J. 1995. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nat. Genet.* 9: 293-298.
- Kidwell MG. Transposable Elements and the Evolution of Dipteran Genomes. In: (ed.) Yeates D.K, Wiegmann B.M. *The Evolutionary Biology of Flies*. New York: Columbia University Press. 2005:145-172.
- King, Robert C. and William D. Stansfield (1997). A Dictionary of Genetics. Fifth Edition. Oxford University Press.
- Krimbas, C.B., 1963. A contribution to the cytogenetics of *Dacus oleae* (Gmel) (Diptera: Trypetidae): the salivary gland and mitotic chromosomes. *Caryologia* 16: 371–376.
- Κλασική και μοριακή γενετική, Τριανταφυλλίδης Κωνσταντίνος, Εκδοτικός οίκος Αδερφών Κυριακίδη α.ε, 2004.
- Lagos Dimitrios, M. Fernanda Ruiz, Lucas Sánchez and Katia Komitopoulou, 2005. Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining *Sex-lethal* and *doublesex* genes of *Drosophila melanogaster* , Gene, 348:111-121.
- Ludvik M. Gomulski, Cristina Torti, Valentina Murelli, Mariangela Bonizzoni, Giuliano Gasperi and Anna R. Malacrida, 2004. Medfly transposable elements: diversity, evolution, genomic impact and possible applications. *Insect Biochem Mol Biol.* 34(2):139-48.
- Martin P, Makepeace K, Hill S, Hood D, Moxon E, 2005. Microsatellite instability regulates transcription factor binding and gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(10):3800-4.

- Marsano R.M, Marconi S., Moschetti R., 2003. MAX, a novel retrotransposon of the BEL-Pao family, is nested within the Bari 1 cluster at the heterochromatic h39 region of the chromosomes 2 in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genomics* 270:477-484.
- Mathiopoulos Kostas D., Jeffrey D. Powell, and Thomas F. McCutchan, 1995. An Anchored Restriction-Mapping Approach Applied to the Genetic Analysis of the *Anopheles gambiae* Malaria Vector Complex. *Mol. Biol. Evol.* 12(1):103-112.
- Mavragani-Tsipidou, P., G. Karamanlidou, A. Zacharopoulou, S. Kolias & C.D. Kastritsis, 1992. Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genome* 35:373-378.
- Mavragani-Tsipidou, P., Z.G. Scouras & C.D. Kastritsis, 1990. Comparison of the polytene chromosomes of the salivary gland, the fat body and the midgut nuclei of *Drosophila auraria*. *Genetica* 81: 99-108.
- Molecular Cell biology, Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Scott, Zipursky, Darnell, Freeman 5th edition, 2004.
- Molecular biology, Turner, McLennan, Bates and White, BIOS 2nd edition, 2000.
- Rohr Cherise, Hillary Ranson, Xuelan Wang and Nora Besansky, 2002. Structure of mtanga, a retrotransposon actively expressed on the Y chromosome of the African Malaria vector *Anopheles gambiae*. *Mol. Biol. Evol.*, 19(2):149-162.
- Severine berard and Eric Rivals, 2003. Comparison of Minisatellites, *Journal of computational biology*, Volume 10, Numbers 3-4.
- Southern, E.M., 1975. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis", *J Mol Biol.*, 98:503-517.
- Stratikopoulos E. E, A. A. Augustinos, A. Gariou-Papalexioy, A. Zacharopoulou & K. D. Mathiopoulos, 2002. Identification and partial characterization of a new *Ceratitis capitata*-specific 44-bp pericentromeric repeat. *Chromosome Research* 10: 287-295.
- Sun X, Wahlstrom J, Karpen GH (1997). Molecular structure of a functional *Drosophila* centromere. *Cell* 91: 1007-1019.
- Unsal K, Morgan GT, 1995. A Novel Group of Families of Short Interspersed Repetitive Elements (Sines) in *Xenopus* - Evidence of a Specific Target Site for DNA-Mediated Transposition of Inverted-Repeat Sines. *Journal of Molecular Biology*, 248(4):812-823.
- Vergnaud Gilles and France Denoeud, 2000. Minisatellites: Mutability and Genome Architecture. *Genome research* Vol. 10, Issue 7, 899-907.
- Vontas J.K, M. J. Hejazi, N. J. Hawkes, N. Cosmidis, M. Loukas and J. Hemingway 2002. Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology* 11(4), 329-336.
- Vossen P., Varela L. and Devarenne A., 2005. Olive Fruit Fly. University of California Cooperative Extension.

- Xiaoping Sun, Hiep D. Le, Janice M. Wahlstrom, and Gary H. Karpen 2003. Sequence Analysis of a Functional *Drosophila* Centromere, genome Res.13:182-194.
- Zambetaki, A., K. Kleanthous & P. Mavragani-Tsipidou, 1995. Cytogenetic analysis of Malpighian tubule and salivary gland polytene chromosomes of *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*) (Diptera:Tephritidae). Genome 38: 1070–1081.
- Zambetaki, A., A. Zacharopoulou, Z.G. Scouras & P. Mavragani-Tsipidou, 1999. The genome of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*: localization of molecular markers by *in situ* hybridization to salivary gland polytene chromosomes. Genome 42:740–751.

Δικτυακοί τόποι:

- <http://www.elialadi.gr>
- <http://www.internationaloliveoil.org>
- [http://www. Berkeley Drosophila Genome Project.com](http://www.BerkeleyDrosophilaGenomeProject.com)

